Untersuchungen zum Xylanabbau durch die Hefe *Trichosporon cutaneum* und Charakterisierung der Xylanase

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Erich Stüttgen
aus Langerwehe

1981

Untersuchungen zum Xylanabbau durch die Hefe *Trichosporon cutaneum* und Charakterisierung der Xylanase

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Erich Stüttgen
aus Langerwehe

1981

Gedruckt mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Sahm
Korreferent: Prof. Dr. C. Hollenberg
Tag der mündlichen Prüfung: 25. November 1981

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie I der Kernforschungsanlage Jülich GmbH ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit und für die stets gewährte Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Frau Doz. Dr. Kula (GBF, Braunschweig) für die Aminosäureanalyse, Herrn Irrgang und Herrn Dr. Schimz für die Zuckeranalysen, Herrn Nöthen für die hochdruckflüssigkeitschromatographischen Untersuchungen, Herrn Dr. Conrad sowie Herrn Dr. Eggeling für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und allen Mitarbeitern des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft.

Abkürzungen

DEAE	Diäthylaminoäthyl-
CMC	Carboxymethylcellulose
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
K_M	Michaelis-Menten Konstante
O.D.	optische Dichte
PCMB	p-Chlormercuribenzoat
PNXP	p-Nitrophenyl-β-D-Xylopyranosid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris(hydroxyl)aminomethan
U	Enzymeinheit (Unit)
V_o	Säulenvolumen
V_e	Elutionsvolumen
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0029

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	2
II.	Material und Methoden	8
1.	Organismus	8
2.	Chemikalien	9
3.	Nährmedien	10
4.	Kulturbedingungen	10
5.	Ernte und Zellaufschluß von Hefen	11
6.	Quantitative Bestimmung des Xylans	11
7.	Bestimmung der Enzymaktivitäten	12
8.	Proteinbestimmung	15
9.	Quantitative Bestimmung des Kohlenhydratanteils der gereinigten Xylanase	17
10.	Elektrophoretische Untersuchungen	18
11.	Säulenchromatographie	22
12.	Dünnschichtchromatographie zur Zuckertrennung	23
13.	Molekulargewichtsbestimmung	24
14.	Weitere Bestimmungsmethoden	25
III.	Ergebnisse	26
1a.	Wachstum von *Trichosporon cutaneum* auf Xylan	26
1b.	Optimierung von Wachstumsparametern	31
2.	Wachstum und Xylanaseproduktion auf verschiedenen Substraten	33
3.	Isolierung der β-Xylanase	34
4.	Charakterisierung der gereinigten β-Xylanase	43
5.	Untersuchungen zum enzymatischen Xylanabbau	59
6.	Untersuchungen zur β-Xylosidase-Aktivität	66
IV.	Diskussion	71
V.	Zusammenfassung	80
VI.	Literaturverzeichnis	82

I. EINLEITUNG

Die sich abzeichnende Verknappung fossiler Energieträger, speziell des Erdöls, Erdgases und der Kohle, hat in den letzten Jahren die Suche nach neuen Energie- und Rohstoffquellen intensiviert. Dabei hat die pflanzliche Biomasse - Abfallprodukte aus Industrie, Land- und Forstwirtschaft, sowie aus Haushalten - immer mehr an Bedeutung gewonnen. Jährlich entstehen auf der Erde infolge Photosynthese etwa $1{,}8 \times 10^{11}$ t pflanzliche Biomasse (Sahm, 1978), von der nur etwa 4 % wirtschaftlich genutzt werden: 1 - 2 % zur Nahrungs- und Futtermittelproduktion, 1 % zur Papiergewinnung und 1 % als Brennholz (Sahm, 1979; Sahm und Schoberth, 1978/79). Darüber hinaus fallen in der Bundesrepublik jährlich etwa 24×10^{6} t Hausmüll an, der zu etwa 40 % aus Cellulose besteht.

Den überwiegenden Teil der pflanzlichen Biomasse (z.B. Holz, Stroh) bilden die Polymeren: Cellulose (40 - 50 %), Hemicellulose (10 - 35 %) und Lignin (15 - 30 %)(Buchholz et al., 1980/81). Der jährliche Zuwachs an Cellulose beträgt etwa 100 Milliarden Tonnen (Reese et al., 1972), sie bildet damit die Hauptmenge der ständig neu gebildeten organischen Substanz. Es folgen die Hemicellulosen, die als Heteroglycane neben Glukose vor allem Xylose, Arabinose, Mannose, Galaktose und Uronsäuren enthalten. Hemicellulosen sind am Aufbau der Zellwand der meisten Landpflanzen beteiligt. Sie kommen hauptsächlich in der Primär- und Sekundärwand vor, wo sie mit Cellulosefasern und Lignin eng verknüpft sind (Bisaria und Ghose, 1981). Die Xylane bilden die Hauptgruppe der Hemicellulosen. Der Anteil des Xylans an der Zellwandsubstanz beträgt bei Laubhölzern 20 - 35 %; bei Nadelhölzern ist er mit 10 - 14 % geringer. In krautigen Pflanzen (z.B. Gräsern) kann er bis zu 45 % der Zellwandsubstanz ausmachen.

Die Xylane sind Polysaccharide, die aus einer Hauptkette aus β-1,4-glycosidisch gebundenen Xylose-Einheiten bestehen. Sie unterscheiden sich in Art und Anzahl ihrer Substituenten (Aspinall, 1959). Das Nadelholzxylan (Abb. 1a) besteht aus einer Hauptkette aus 100 - 120 β-1,4-glycosidisch gebundenen Xyloseresten. Im Durchschnitt trägt jeder 4. - 5. Xyloserest eine 4-O-Methyl-α-D-Glucuronsäure (am C-2 oder C-3 der Xylose gebunden). Jeder 8. - 9. Xyloserest trägt eine Arabinosylgruppe, gebunden am C-3 der Xylose. Acetylgruppen sind wahrscheinlich nicht vorhanden.

Dem gegenüber besteht die Hauptkette des Laubholzxylans aus etwa 200 β-1,4-glycosidisch gebundenen Xylose-Einheiten. Sie ist im Hinblick auf die 4-O-Methyl-α-D-Glucuronsäure geringer substituiert; etwa jeder 10. Xyloserest trägt eine Methyl-Glucuronsäure, die am C-2 der Xylose gebunden ist. Den Laubholzxylanen fehlen die Arabinosylgruppen. Statt dessen besitzen sie O-Acetylgruppen, die am C-3 der Xylose gebunden sind. Von 10 Xyloseresten weisen 6 - 7 eine solche Acetylgruppe auf (Abb. 1b).

Im Gegensatz zum Nadel- und Laubholzxylan ist das Xylan aus krautigen Planzen durch einen höheren Anteil an Arabinose-Gruppen und einen geringeren Anteil an Uronsäuren (Abb. 1c) charakterisiert.

Während die enzymatische Hydrolyse von Cellulose schon in vielen Arbeiten intensiv und genau untersucht wurde, sind die Kenntnisse über den Abbau von Xylanen noch vergleichsweise gering. Aus einem Übersichtsartikel von Dekker und Richards (1976) geht hervor, daß die meisten der untersuchten Xylanasen pilzlichen Ursprungs sind. Von einigen Pilzen ist bekannt, daß sie mehrere Xylanasen mit unterschiedlichem Wirkungsmuster gegenüber Xylan produzieren. So berichten Dekker und Richards (1975a; 1975b) über die Produktion von wenigstens 5 Xylanasen durch *Ceratocystis paradoxa*, und aus dem Kulturfil-

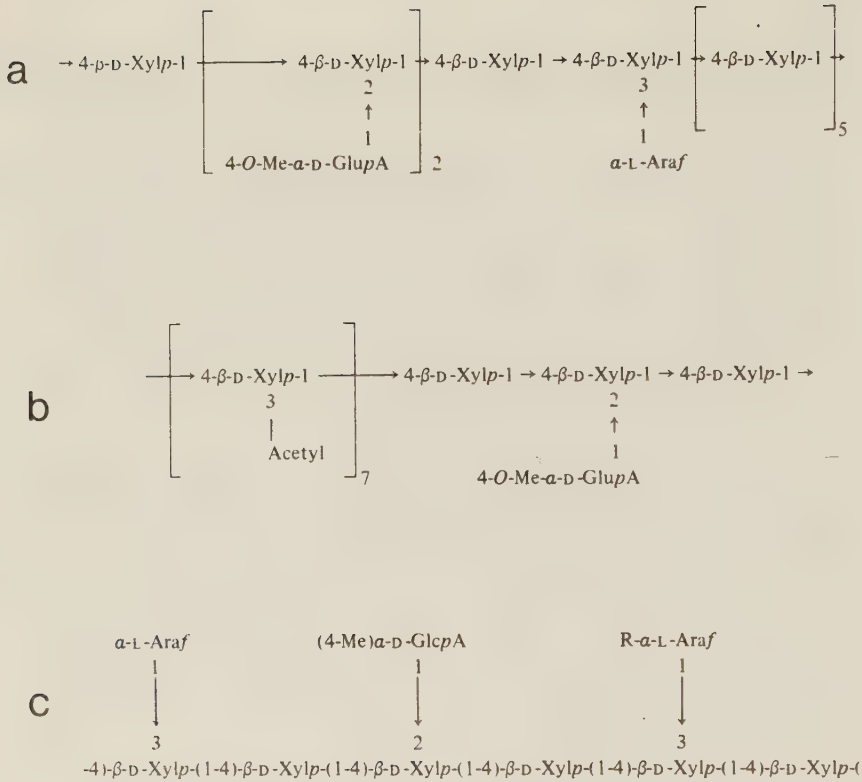


Abb. 1: Xylan-Struktur von typischen Planzen der gemäßigten Breiten.
a: Nadelholzxylan (nach Aspinall und McKay, 1958)
b: Laubholzxylan (nach Zinbo und Timell, 1965)
c: Xylan aus krautigen Pflanzen (nach Aspinall, 1980)
Abkürzungen: Xylp, Xylopyranose; L-Araf, L-Arabinofuranose; GlupA bzw. GlcpA, 4-O-Methyl-α-D-Glucuronsäure

trat von *Trichoderma viride* wurden 2 Xylanasen isoliert und in kristalliner Form erhalten (Hashimoto et al., 1971). Die meisten Xylanasen aus Pilzen haben Endoenzym-Charakter, wogegen *Aspergillus batatae* (Fukui und Sato, 1957) und *Aspergillus*

foetidus (Whistler und Masak, 1955) Xylanasen vom Exotyp zu synthetisieren scheinen. Um sicher zu sein, daß es sich bei dieser Exo-Xylanase-Aktivität nicht um β-Xylosidase-Aktivität handelt, wären allerdings weitere Untersuchungen erforderlich.

Xylanaseproduktion bei Bakterien ist ebenfalls schon wiederholt beschrieben worden. So zum Beispiel bei *Streptomyceten* (Sreenath et al., 1978; Iizuka und Kawaminami, 1965; Nakanishi und Yasui, 1980), bei Bacillus-Stämmen (Inaoka und Soda, 1956; Fogarty und Griffin, 1972) oder auch bei *Xanthomonas* (Reddy et al., 1974). Bekannt ist, daß xylanspaltende Bakterien im Darm angesiedelt sind, wo sie zusammen mit cellulolytischen Bakterien am Abbau der pflanzlichen Zellwand beteiligt sind. So fand man im Darm von Wiederkäuern die hemicellulolytischen Bakterien *Ruminococcus flavefaciens* (Pettipher und Latham, 1979a; 1979b) oder Arten von *Butyrivibrio fibrisolvens* (Clarke et al., 1969). Im menschlichen Magen und Dünndarm können Zellwandpolysaccharide (unter anderem Xylan) sowie Lebensmittelzusätze (verdickende und stabilisierende Agenzien) nicht verwertet werden. Doch auch hier konnte kürzlich gezeigt werden, daß solch komplexe Kohlenhydrate im Dickdarm von der vorhandenen Darmflora hydrolysiert werden (Salyers et al., 1977a; 1977b) und somit möglicherweise noch zum Teil als Nährstoffe zur Verfügung stehen.

Bisher ist über den Xylanabbau von Hefen wenig bekannt. Man fand aber auch einige Hefestämme, die auf Xylan als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen können. So die Hefe *Cryptococcus albidus var. aerius*, die eine zellwandgebundene Xylanase besitzt (Notario et al., 1979). Von Biely et al. (1980a) wurde eine Xylanase aus dem Kulturfiltrat der Hefe *Cryptococcus albidus* gereinigt und intensiv charakterisiert. Ebenso ist der Xylanabbau durch die Hefe *Trichosporon cutaneum* bekannt (Stevens und Payne, 1977).

Zur vollständigen Hydrolyse des Xylans zu Xylose sind mehrere Enzyme notwendig (Puls et al., 1978; Howard et al., 1960)(Abb. 2). (1) Endo-β-1,4-Xylanasen, (1,4-β-D-Xylan-Xylanohydrolasen, EC 3.2.1.8.) die regellos innerhalb der Xylankette spalten bis zu den Hauptendprodukten Xylobiose, Xylose sowie Xylotriose. (2) β-1,4-Xylosidasen, (β-D-Xylosid-Xylohydrolasen, EC 3.2.1.37.) die Xylobiose und Xylooligomere bis hin zur Xylose hydrolysieren; diese Reaktion könnte zusätzlich von Exo-β-1,4-Xylanasen durchgeführt werden. (3) α-1,2-Glucosiduronasen, die 4-O-Methyl-α-D-Glucuronsäure von Xylooligomeren abspalten. Obwohl Arabinosesubstituenten von einigen Xylanasen abgespalten werden können (Iwamoto et al., 1973; Takenishi und Tsujiasaka, 1973), wird diese Fähigkeit oft einem anderen Enzym, der Arabinosidase zugeschrieben (Strobel, 1963; Gremli, 1968).

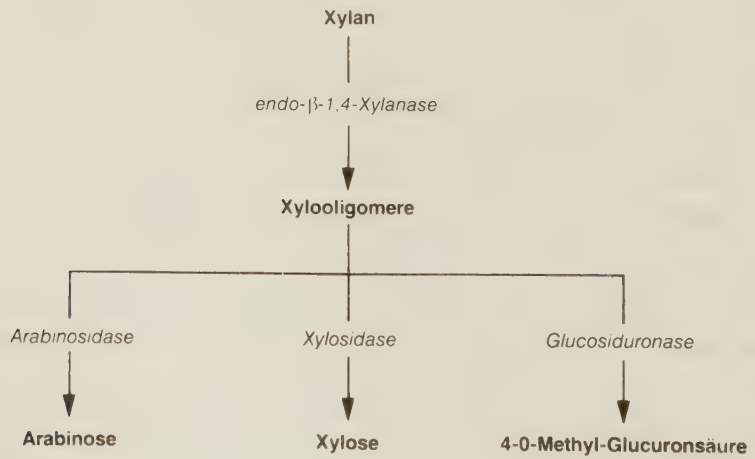


Abb. 2: Enzymatische Hydrolyse von Xylan

Es wäre denkbar, mit Hilfe dieser Enzyme - bzw. der Organismen, die diese Enzyme bilden - xylanhaltige, pflanzliche Rohstoffe technologisch zu nutzen, ähnlich, wie dies bereits durch enzymatische Hydrolyse von Stärke geschieht. Die dabei anfallende Xyloselösung könnte direkt als Nahrungsmittel verwendet werden.(Tangnu et al., 1981) oder als Ausgangssubstanz für chemische Synthesen und biotechnologische Prozesse eingesetzt werden.

Chemisch oder auch biologisch läßt sich Xylose zu dem 5-wertigen Alkohol Xylit reduzieren, der möglicherweise in der Lebensmittelindustrie für Diabetiker als Zuckeraustauschstoff interessant ist. Auch die Vergärung von Xylose zu Äthanol ist mit Mikroorganismen denkbar (Sahm und Schoberth, 1978). Xylan-hydrolysierende Enzyme selbst können industriell zur Klärung von Fruchtsäften und Weinen eingesetzt werden (Inoue et al., 1970a; 1970b; Montedoro und Bertuccioli, 1976).

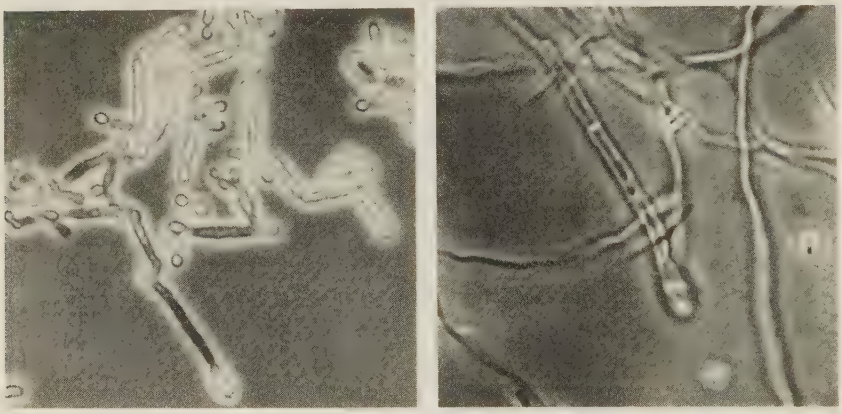
Es bietet sich aber auch zur Produktion von Einzellerprotein an, Xylan ohne vorherige Verzuckerung direkt als Substrat zu benutzen. Dabei wäre es vorteilhaft, mit Hefen zu arbeiten, da sie für die Produktion von Einzellerprotein besonders geeignet sind. Bevor man aber versucht, mit Hilfe von Hefen xylanhaltige Abfälle ohne Vorbehandlung in Einzellerprotein umzusetzen, sind genaue Kenntnisse über die daran beteiligten Enzymsysteme nötig.

Diese Gesichtspunkte waren Veranlassung, den Xylanabbau durch *Trichosporon cutaneum* zu untersuchen und die Xylanase dieser Hefe zu isolieren und zu reinigen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Organismus

In dieser Arbeit wurde die Hefe *Trichosporon cutaneum* (DSM 70698) als Xylanaseproduzent verwendet.



a b

Abb. 3: Phasenkontrastaufnahme der Hefe *Trichosporon cutaneum*
a: nach Wachstum auf Minimalmedium mit 1 % Glukose als C-Quelle (2450-fache Vergrößerung)
b: nach Wachstum auf Minimalmedium mit 1 % Xylan als C-Quelle (2600-fache Vergrößerung).

Die Zellen von *Trichosporon cutaneum* neigen zur Mycelbildung. Das mycelartige Wachstum ist besonders stark auf Xylan als Kohlenstoffquelle ausgeprägt.

Chemikalien

Für Versuche verwendete, nachfolgend aber nicht aufgeführte Chemikalien waren analysenreine Substanzen der Firma Merck, Darmstadt.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Avicel	Serva, Heidelberg
Azocasein	Sigma, München
Bacto Agar	Difco Lab., Detroit, USA
Bio Gel P-100	Bio-Rad Lab., München
Carboxymethylcellulose	Serva, Heidelberg
Coomassie-Brillantblau G 250	Serva, Heidelberg
DEAE-Cellulose DE 32	Whatman, Maidstone, GB
Eichproteine für die Gelfiltration	Pharmacia Chem., Uppsala, Schweden
Eichproteine für die SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese	Boehringer, Mannheim
Hefeextrakt	Difco Lab., Detroit, USA
Malzextrakt	Difco Lab., Detroit, USA
p-Nitrophenyl-β-D-Xylopyranosid	Sigma, München
Remazolbrillantblau-R	Farbwerke Hoechst, Frankfurt
Solka Floc	Brown Co., Berlin
TEMED	Serva, Heidelberg
Ultrafilter UM 10, PM 5	Amicon, Witten
Xylan aus Haferspelzen	Roth, Karlsruhe
Xylan aus Lärchenholz	Sigma, München
Xylan aus Buchenholz	Institut f. Holzchemie, Hamburg

3. Nährmedien

Komplettmedium:

Hefeextrakt	4 g	
Malzextrakt	10 g	Der pH wurde mit 0,1 N HCl
Glukose	4 g	auf 6 eingestellt.
A. dest.	1000 ml	

Minimalmedium:

KH_2PO_4	5 g	
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,5 g	
NH_4Cl	2,5 g	
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	0,1 g	Der pH wurde mit 1 N NaOH
Hefeextrakt	0,2 g	auf 6 eingestellt.
C-Quelle	10 g	
A. dest.	1000 ml	

Zur Verfestigung der Medien wurde bei Bedarf 2 % (w/v) Bacto Agar zugesetzt. Die Medien wurden 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Die entsprechenden Kohlenstoffquellen sowie $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ wurden stets getrennt autoklaviert.

4. Kulturbedingungen

Die Vor- und Hauptkulturen wurden submers auf einer rotierenden Schüttelmaschine (100 U/Min.) bei 27 °C gezüchtet. Die Vorkulturen wurden in 500-ml-Erlenmeyerkolben mit 2 Einbuchtungen in 100 ml Komplettmedium kultiviert. Die Inkubationsdauer betrug 24 h.

Für die Hauptkulturen wurden 2-l-Erlenmeyerkolben mit 2 Einbuchtungen, die 400 ml Minimalmedium enthielten, verwendet. Die Kulturen wurden mit etwa 1,4 mg Zellen einer mit steriler Saline (0,9 % NaCl) gewaschenen Vorkultur angeimpft. Die In-

kubationszeit betrug 3 Tage. Das Wachstum wurde durch Trübungsmessung ermittelt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Zeiss Spektralphotometer PM 6 gegen zellfreies Medium als Blindwert. Parallel dazu wurde der Xylanabbau während des Wachstums nach Hydrolyse der Kulturlösung über die Abnahme der Zuckerkomponenten im Xylan gemessen.
Für die Stammhaltung wurden Schrägagarröhrchen mit Komplettmedium alle 8 - 10 Wochen neu beimpft und bei 4 °C aufbewahrt.

5. Ernte und Zellaufschluß von Hefen

Die durch Zentrifugation (10 Min., 7000 x g) geernteten Zellen wurden zweimal mit Acetatpuffer (0,05 M, pH 5) gewaschen und in demselben Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend quantitativ in eine bei -20 °C vorgekühlte X-Presse (AB Biox, Nacka, Schweden) überführt, 2 Stunden bei -20 °C tiefgefroren, und dann mittels einer Hydraulikpresse mehrmals durch eine Öffnung von 0,8 mm Durchmesser gepreßt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (20 Min., 30 000xg) und der zellfreie Überstand für weitere Untersuchungen verwendet.

6. Quantitative Bestimmung des Xylans

Die saure Totalhydrolyse des Xylans (bzw. der Kulturlösung) wurde nach einer von Dietrichs et al. (Institut f. Holzchemie, Hamburg, unveröffentliche Arbeit) beschriebenen Methode durchgeführt.
1 ml einer 1-prozentigen Xylansuspension (in A. dest.) wurde mit 36 µl 72-prozentiger H_2SO_4 versetzt und 1 h bei 121 °C erhitzt. Anschließend wurde das Hydrolysat mit Aqua dest. auf 2,5 ml aufgefüllt. Nach Abzentrifugieren eventueller Nieder-

schläge (5 Min., 4000 x g) wurden die freigesetzten Zucker im Hydrolysat über einen Biotronik Sugar Analyzer quantitativ bestimmt. Die Trennung der Zucker erfolgte an einem Anionenaustauscher (Typ DA-X4-20) in Boratform (0,45 M, pH 9,45) (Voelter et al., 1974; Kesler, 1967).

7. Bestimmung der Enzymaktivitäten

a) β-Xylanase (1,4-β-D-Xylan-Xylanohydrolase, E.C. 3.2.1.8.)

Die Xylanaseaktivität wurde mit Haferspelzenxylan (1 % (w/v) in 0,05 M Acetatpuffer, pH 5) als Substrat bestimmt. Man erreicht eine homogene Xylansuspension durch 15-minütige Ultraschallbehandlung der Suspension (Branson Sonifier, Cell Disrupter B15, Methode nach John et al., 1979).

Der Reaktionsansatz (0,5 ml) zur Bestimmung der Enzymaktivität enthielt:

gepufferte Xylansuspension	0,45 ml
Enzymlösung a: Kulturfiltrat	0,01 - 0,05 ml
b: gereinigte Xylanase	21 µg/ml
0,05 M Acetatpuffer, pH 5	jeweils auf 0,5 ml aufgefüllt

Nach 10 Minuten Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml Reaktionsgemisch AB (s.S. 13) beendet und das unlösliche Xylan abzentrifugiert (15 Min., 32 000 x g). Die durch den enzymatischen Abbau aus dem Substrat freigesetzten reduzierenden Zucker wurden im Überstand nach der Methode von Nelson und Somogyi (1944, 1952) nachgewiesen. Dazu wurde der Ansatz 20 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach 10-minütiger Abkühlung im Eisbad wurden 0,5 ml Lösung C zugegeben und nach 10 Minuten mit Aqua dest. auf 12,5 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Extinktionsmessung bei 520 nm. Die Menge an freigesetzten Zuckern ist ein Maß für die Enzymaktivität.

Eine Enzymeinheit entspricht der Enzymmenge, die unter den angegebenen Bedingungen 1 µmol red. Zucker (äquivalent mit Xylose) pro Minute freisetzt. Die spezifische Aktivität wurde definiert als Enzymeinheiten (U) pro Milligramm Protein.

Lösungen für die Somogyi-Nelson Methode:

Lösung A: 25 g wasserfreies Natriumcarbonat
25 g Kalium-Natrium-Tartrat
20 g Natriumhydrogencarbonat
20 g wasserfreies Natriumsulfat
A. dest. 1000 ml

Statt der in der Literatur angegebenen 200 g Natriumsulfat wurden nur 20 g eingesetzt, da bei der hohen Konzentration nach der Reaktion eine Trübung eintrat, die wahrscheinlich durch Substanzen im Kulturfiltrat verursacht wurde. Diese Veränderung hatte keinen Einfluß auf die Bestimmung der Ausbeute an reduzierenden Zuckern.

Lösung B: 15 g $CuSO_4 \times 5\ H_2O$
A. dest. 100 ml
Zwecks besserer Löslichkeit werden 2 Tropfen konz. Schwefelsäure zugefügt.

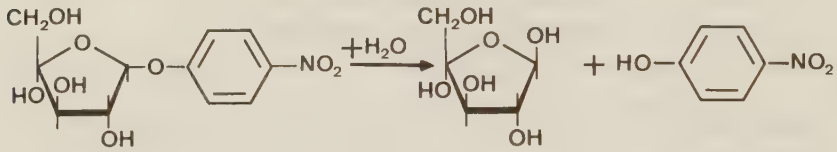
Lösung C: 25 g Ammoniumheptamolybdat werden in 450 ml A. dest. gelöst. Nach Zugabe von 21 ml konz. Schwefelsäure werden
3 g $Na_2HAsO_4 \times 7\ H_2O$ (vorher in 25 ml A. dest gelöst) zugegeben.
Der Ansatz wird in einer geschlossenen dunklen Flasche 48 h bei 37 °C inkubiert.

Vor Beginn der Analyse wird eine Reaktionsmischung aus 25 Vol. Lösung A und 1 Vol. Lösung B hergestellt (entspricht Reaktionsgemisch AB).

b) β-Xylosidase

Die Aktivität der Xylosidase wurde mit dem synthetischen Substrat p-Nitrophenyl-β-D-Xylopranosid bestimmt, da das natürliche Substrat Xylobiose nicht verfügbar war (Notario et al., 1976; John et al., 1979).

Die β-Xylosidase spaltet dieses Substrat in Xylose und p-Nitrophenol:



PNXP Xylose p-Nitrophenol

p-Nitrophenol ist im basischen Milieu gelb gefärbt. Die Extinktion des Farbstoffes wird bei 405 nm in einem Zeiss Spektralphotometer gemessen; die Farbintensität ist eine Funktion der Enzymaktivität.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

PNXP 20 mMol in 0,1 M Mc Ilvaine Puffer pH 5	1 ml
Enzymlösung (Kulturfiltrat oder Rohextrakt)	0,1 - 0,5 ml
0,1 M Mc Ilvaine Puffer	jeweils auffüllen auf 1,5 ml Gesamtvolumen des Ansatzes

Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 37 °C über einen Zeitraum von 15 - 30 Minuten. Die Reaktion wurde durch Alkalisieren des Ansatzes mit 2 ml Na_2CO_3-Lösung (1 M) beendet. Nach Zugabe von 10 ml A. dest. wurde die Extinktion bei 405 nm gemessen.

Eine Enzymeinheit (U) ist definiert als die Enzymmenge, die 1 µMol p-Nitrophenol pro Minute aus dem Substrat freisetzt. Die spezifischen Aktivitäten sind die Enzymeinheiten (U) pro Milligramm Protein.

c) Protease

Proteaseaktivität wurde mit Azocasein bestimmt (Nakane, 1978; Prestidge et al., 1971).
0,5 ml einer 1-prozentigen (w/v) Azocaseinlösung (in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 5,5) wurden mit 0,1 ml Enzymlösung 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 2 ml 10-prozentiger TCA wurde die Reaktion beendet. Nach Abfiltrieren des Niederschlags und Zugabe von 0,3 ml 10 M NaOH zum Filtrat wurde die Extinktion bei 430 nm gemessen. Die Enzymaktivität wurde errechnet aus der Formel (John, M., persönliche Mitteilung):

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{E_{430} \times 1000}{t \times v} \quad \text{(U/ml)}$$

mit v = Probevolumen
t = Inkubationszeit

8. Proteinbestimmung

Protein wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

Das Bradford-Reagenz setzt sich wie folgt zusammen:

Coomassie Brillant Blau G 250 (in 50 ml 95 % Äthanol gelöst)	0,1 g
Phosphorsäure, 85 %	100 ml
Aqua dest.	850 ml

Zu 100 µl einer Proteinlösung (0,5 - 1 mg Protein/ml) wurden 5 ml dieser Reagenzlösung zugegeben, gemischt und nach 2 Minuten Reaktionszeit wurde dann die Extinktion bei 595 nm gemessen. Bei sehr kleinen Proteinkonzentrationen (0,01 - 0,1 mg Protein/ml) wurden 100 µl der Proteinlösung mit 1 ml Reagenz versetzt. Die Extinktionsmessung erfolgte ebenfalls nach einer Reaktionszeit von 2 Minuten.
Aus der Eichkurve mit Rinderserumalbumin wurde der Proteingehalt der Proben ermittelt (Abb. 4).

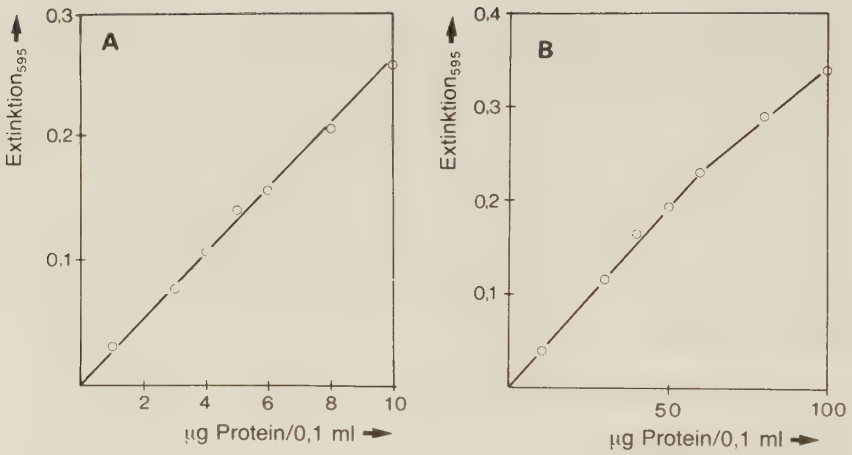


Abb. 4: Eichkurven zur Proteinbestimmung nach Bradford.
A: für Proteinmengen von 0,01 - 0,1 mg Protein/ml
B: für Proteinmengen von 0,5 - 1 mg Protein/ml

Proteinbestimmung in ganzen Zellen

Bei der Proteinbestimmung in ganzen Zellen wurde die Biuret-Methode angewendet, wie sie von Herbert et al. (1972) beschrieben wurde (Abb. 5).

Verwendete Lösungen:

NaOH	3 N
$CuSO_4$ x 5 H_2O	2,5 % (w/v)
Proteinstandard (RSA)	5 mg/ml

2 ml einer gewaschenen Zellsuspension wurden mit 1 ml 3 N NaOH gemischt, 5 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt und nach Abkühlen mit 1 ml $CuSO_4$ X 5 H_2O (2,5 %) versetzt. Nach kräftigem Schütteln und 5-minütigem Erhitzen im kochenden Wasserbad wurde der Niederschlag abzentrifugiert. Die Extinktion des Überstandes wurde bei 555 nm gemessen.

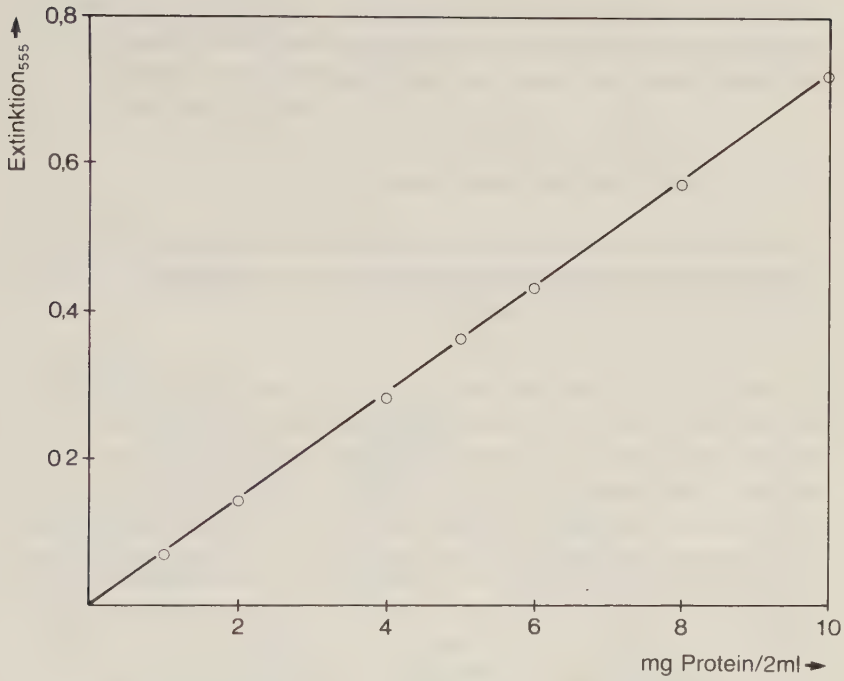


Abb. 5: Eichkurve zur Proteinbestimmung in ganzen Zellen nach Herbert et al. (1972).

9. Quantitative Bestimmung des Kohlenhydratanteils der gereinigten Xylanase

Der Kohlenhydratanteil im Enzym wurde nach einer von Sprey et al. (persönliche Mitteilung) modifizierten Methode von Spiro (1972) bestimmt.

0,8 ml Enzymlösung (0,5 - 1,5 mg Protein) wurden mit 0,2 ml 1 N Schwefelsäure 24 h bei 100 ^{o}C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde anschließend mit gesättigter Bariumhydroxidlösung neutralisiert und über eine Kationenaustausch-Chro-

matographie an Dowex 50 Wx 8 entsalzt. Der aus dem Enzym freigesetzte Zuckeranteil wurde quantitativ in einem Biotronik Sugar Analyzer an einem Anionenaustauscherharz in Boratform (0,45 m; pH 9,45; Typ DA-x4-20) bestimmt.

10. Elektrophoretische Untersuchungen

Die Gel-Elektrophoresen wurden in einem Plattengel-Elektrophoresegerät von Bio-Rad, Modell 220, durchgeführt.

a) Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

Die analytische und präparative Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde mit 7,5-prozentigen Flachgelen in einem leicht modifizierten Trennsystem nach Maurer (1971) durchgeführt. Die Dicke der Flachgele betrug 1,5 mm für die analytischen Elektrophoresen, und 5 mm für die präparativen Elektrophoresen. Für die Präparation der Gele wurden folgende Lösungen hergestellt:

Lösung 1:	1 N HCl	48 ml	
	Tris	36,3 g	
	TEMED	0,23 ml	
	mit Aqua dest. auf	100 ml	auffüllen
Lösung 2:	Acrylamid	30 g	
	Bisacrylamid	0,8 g	
	mit Aqua dest. auf	100 ml	auffüllen
Lösung 3:	Ammoniumperoxidisulfat	0,14 g	
	mit Aqua dest. auf	100 ml	auffüllen
Lösung 4:	1 N HCl	48 ml	
	Tris	5,98 g	
	TEMED	0,46 ml	
	mit Aqua dest. auf	100 ml	auffüllen

Lösung 5:	Acrylamid	10 g
	Bisacrylamid	2,5 g
	mit Aqua dest. auf	100 ml auffüllen
Lösung 6:	Riboflavin	4 mg
	Aqua dest.	100 ml

Die Trenngele wurden durch Mischen der Lösungen 1,2,3 und H_2O im Verhältnis 1:2:4:1 hergestellt, die Sammelgele durch Mischen der Lösungen 4,5,6 und H_2O im Verhältnis 1:2:1:4.

Elektrodenpuffer:

Tris	6 g	
Glycin	28,8 g	pH 8.3
Aqua dest.	1000 ml	

Der Puffer wurde vor Gebrauch 1:10 verdünnt.

Pro Geltasche wurden 60-100 µg Protein aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 1,5 mm dicken Gelen mit einer Stromstärke von 14 mA (Sammelgel) bzw. 16 mA (Trenngel) und bei 5 mm dicken Gelen mit 20 mA (Sammelgel) bzw. 25 mA (Trenngel). Der gesamte Trennungsvorgang erfolgte bei Wasserkühlung.

Proteinfärbung

Nach der Auftrennung wurden die Gele nach einer modifizierten Methode von Fairbanks (1971) über Nacht gefärbt. Die aufgetrennten Proteine färben sich dabei tiefblau.

Die Färbungslösung enthielt:

Coomassie Brillant Blau R250	0,05 % (w/v)
Isopropanol	25 % (w/v)
Essigsäure	10 % (w/v)

Die Gele wurden mit 10 % Essigsäure entfärbt.

Die laut Literatur nachfolgende Färbung in 10 % Isopropanol, 10 % Essigsäure mit 0,005 % Coomassie entfiel, da sie keine weitere Farbintensivierung zur Folge hatte.

Um zu ermitteln, welche Proteinbanden im Gel β-Xylanase-Aktivität besaßen, wurde ein ungefärbtes Gel in parallele Streifen geschnitten und diese in einer 1-prozentigen Xylansuspension (in 0,05 M Acetatpuffer, pH 5) 1 h bei 30 °C inkubiert. Nach Abzentrifugieren des ungelösten Xylans (15 Min., 32 000 x g) wurden im Überstand die freigesetzten reduzierenden Zucker bestimmt (Somogyi, Nelson; 1952, 1944).

Die präparative Gelelektrophorese wurde wie von Bringer (1980) beschrieben, durchgeführt. Die Lage der Proteine im Gel wurde dadurch sichtbar, daß ein Filterpapierabdruck der oben beschriebenen Proteinfärbung unterzogen wurde. Nach Vergleich der Proteinbanden wurde der Xylanase-Aktivität enthaltende Bereich aus dem Gel herausgeschnitten. Das Enzym wurde mit Aqua dest. eluiert und anschließend das Gelmaterial mit Hilfe einer Ultrazentrifuge abzentrifugiert (Beckmann Ultrazentrifuge, Modell L 2-65 B, Rotor TE 50, 45 Min., 30 000 U/Min). Nach Wiederholung des Elutionsvorganges wurden die Überstände vereinigt, gegen Acetatpuffer (0,05 M, pH 5) dialysiert und durch Ultrafiltration (Amicon, PM 5) eingeengt.

Glykoproteinfärbung

Zur Glykoproteinfärbung wurden die Gele in Schiff's Reagenz (Fuchsin/Schweflige Säure) nach der Methode von Zacharius und Zell (1969) gefärbt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst zum Fixieren 30 Minuten lang in 12,5-prozentige TCA gelegt, anschließend in Aqua dest. gewaschen und für 50 Minuten in 1-prozentige (w/v) Perjodsäure (hergestellt in 3-prozentiger Essigsäure) überführt. Das Gel wurde dann über Nacht mit Aqua dest. bei leichtem Schütteln gewaschen und anschließend 50 Minuten in Schiff's Reagenz gegeben, wobei sich die vorhandenen Glyko-

proteine rot färben. Danach wurde mit frisch hergestellter 0,5-prozentiger (w/v) Natriummetabisulfit-Lösung 3 X 10 Minuten gespült. Nach Auswaschen des nicht gebundenen Farbstoffes mit Aqua dest. konnten die gefärbten Gele in 3 bis 7,5-prozentiger (v/v) Essigsäure aufbewahrt werden.

b) Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS)

Die SDS-Gelelektrophoresen wurden in 11 %-igen Polyacrylamid Gelen nach einer von Bringer (1980) modifizierten Methode von Neville (1971) durchgeführt. Es wurden folgende Lösungen verwendet:

Lösung A: oberer Elektrodenpuffer

Borsäure	0,04 M	
Tris	0,041 M	pH 8,64
SDS	0,1 %	

Lösung B: unterer Elektrodenpuffer

Tris-HCl	0,424 M	pH 9,18

Lösung C: Trenngel

Acrylamid	11	% (w/v)
Bis	0,1	% (w/v)
TEMED	0,15	% (v/v)
Ammoniumperoxidisulfat	0,05	% (w/v)

Vorratslösungen für das Trenngel

a)	Acrylamid	55	g/100 ml Lösung B
b)	Bis	1	g/100 ml Lösung B
c)	TEMED	0,75	g/100 ml Lösung B
d)	Ammoniumperoxidisulfat	0,5	g/100 ml Lösung B

Die Trenngele wurden durch Mischen der Vorratslösungen a,b, c,d und Lösung B im Verhältnis 2:1:1:1:5 hergestellt.

Lösung D: Vorratslösung für das Sammelgel

Teil a:	Sammelgel-Puffer			
	Tris-H_2SO_4	0,216	M	pH 6,1
	TEMED	0,33	% (v/v)	
Teil b:	Acrylamid	12	g	
	Bis	0,8	g	
	mit Aqua dest auf	100	ml	auffüllen
Teil c:	Riboflavin	4	mg/100 ml	Aqua dest.

Die Sammelgele wurden durch Mischen der Vorratslösungen a, b,c und H_2O im Verhältnis 1:2:1:4 hergestellt.

Vorbereitung der Proteinproben:

Die Proben (0,15 - 0,25 mg Protein/ml) wurden 1 Minute bei 100 °C in Tris-H_2SO_4-Puffer (0,216 M, pH 6,1) in Gegenwart von 2 % SDS und 10 % (v/v) 2-Mercaptoäthanol erhitzt.

11. Säulenchromatographie

Sämtliche Versuche wurden bei 4 °C durchgeführt.

a) Ionenaustauschchromatographie

Vorversuche im Batch-Verfahren ergaben, daß die Xylanase von einem Anionenaustauscher (DEAE-Cellulose, DE 32), äquilibriert mit Kaliumphosphat-Puffer (0,01 M, pH 7), adsorbiert wird. Das Enzym konnte dann mittels eines NaCl-Gradienten (0,1 - 0,3 M) wieder eluiert werden. Die Trennung erfolgte über eine mit DEAE-Cellulose gefüllte Säule (2,6 x 32 cm), nachdem diese mit Kaliumphosphat-Puffer (Äquilibrierungspuffer)mit 0,02 % Natriumazid äquilibriert worden war. Nach Auftragen der Probe und Waschen mit 350 ml Äquilibrierungspuffer wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0,1 - 0,3 M NaCl (in dieser Pufferlösung) eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 45 ml/h, die Fraktionsgröße 5 ml. Im Eluat vorhandenes Protein wurde in einem

Zeiss Spektralphotometer PM 6 bei 280 nm gemessen. Parallel dazu erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford (1976).

Die Fraktionen mit Xylanaseaktivität wurden vereint, durch Ultrafiltration (Amicon, PM 10) konzentriert und anschliessend gegen Kaliumphosphatpuffer (0,05 M, pH 5,5) 24 h dialysiert.

b) Gelfiltration

Als Säulenmaterial wurde Bio-Gel P-100 (100 - 200 mesh) verwendet. Die Säule (2,6 x 92 cm) wurde mit 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 5,5 äquilibriert; der Puffer enthielt 0,1 M Natriumchlorid zur Erhöhung der Molarität, um dadurch Wechselwirkungen zwischen der Gelmatrix und der Proteinprobe auszuschalten. Zur Verhinderung von Infektionen wurde 0,02 % Natriumazid zugegeben. Die Proteine wurden mit der gleichen Pufferlösung bei einer Durchflußrate von 8 ml/h in 2,5 ml Fraktionen eluiert.

12. Dünnschichtchromatographie zur Zuckertrennung

Die Chromatographien wurden auf Kieselgel-60-Fertigplatten (0,25 mm) der Firma Merck, Darmstadt, durchgeführt.
Als Laufmittel wurde n-Butanol-Isopropanol-Wasser (3:12:4) verwendet(Kanaya et al., 1978).Besprüht wurden die Platten mit Naphthoresorcin-Schwefelsäure.

Herstellung dieser Sprühlösung (Stahl, 1969)

Lösung 1: Naphthoresorcin (Naphthalindiol-1,3)
0,2 g/100 ml Äthanol

Lösung 2: Schwefelsäure 20 % (v/v)

Vor Gebrauch werden gleiche Volumina von 1 und 2 gemischt.

Die Chromatogramme wurden anschließend 10 - 15 Minuten bei 100 - 105 ^{o}C entwickelt.

13. Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht der Xylanase wurde sowohl durch Gelfiltration als auch durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt.

a) Gelfiltration (Andrews, 1964)

Die Gelfiltration an Bio-Gel P-100 zur Molekulargewichtsbestimmung erfolgte unter gleichen Bedingungen wie unter II. 11 beschrieben.
Die Säule wurde mit folgenden Eichproteinen kalibriert: Ribonuclease A (MG = 13700), Chymotrypsin A(MG = 25000), Ovalbumin (MG = 43000), Rinderserumalbumin (MG = 68000). Das Leervolumen der Säule wurde mit Dextran Blau bestimmt und das Molekulargewicht der Proteine als Funktion ihrer Elutionsvolumina (V_e/V_o) halblogarithmisch aufgetragen.
V_e = Elutionsvolumen, V_o = Elutionsvolumen von Dextran Blau.

b) SDS-Gelelektrophorese (Neville, 1971)

Diese Gelelektrophorese erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie unter II.10b beschrieben. Als Eichproteine wurden benutzt: Trypsin Inhibitor (MG = 21500), Rinderserumalbumin (MG = 68000) und RNA-Polymerase aus E.coli (MG der Untereinheiten = 39000, 155000, 165000) (Burgess, 1969; Wu und Scheraga, 1962).
Da nach Weber und Osborn (1969) die elektrophoretische Beweglichkeit von Proteinen in Gegenwart von SDS dem Logarithmus ihrer Molekulargewichte proportional ist, konnte das Molekulargewicht der Xylanasebande bestimmt werden, indem man ihre Wanderungsstrecke in die Auftragung: Wanderungsstrecke = f(log Molekulargewicht der Eichproteine) einordnete.

14. Weitere Bestimmungsmethoden

a) Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Analysen aus der Untersuchung des Spaltungsmusters der Xylanase wurden in einem HPLC-Gerät der Firma Hewlett-Packard, 1084 B, durchgeführt.

Die Trennung der Kohlenhydrate erfolgte an einem Kationenaustauscherharz von Bio-Rad (Aminex, Carbohydrate HPX 42, Korngröße 25 µm) bei einer Durchflußrate von 5 ml/Minute. Die Kohlenhydrate wurden mit einem Differentialrefraktometer (Knauer, Betriebstemperatur 35 °C) als Detektor analysiert (Schmidt et al., 1981).

b) Aminosäureanalyse

Für die Aminosäureanalyse wurde die gereinigte Xylanase in 6 N HCl für 24 h bzw. 49 h und 72 h bei 106 °C in einer Kapillare hydrolysiert. Die Analysen wurden anschließend auf einem Biotronik-Chromatographie-System LC 6000 ausgeführt.

c) Färbung von Xylan

Das Färbeverfahren ist bereits für verschiedene Polysaccharide wie Mannan (Stüttgen, 1976), Stärke, Cellulose (Bonse, 1974) und andere beschrieben worden, und von Moraw (1979) auf Xylan übertragen worden. Beim Färbeprozess wird der Farbstoff (Remazolbrilliantblau-R) im Alkalischen über eine kovalente Bindung an das Xylan gekoppelt. Der überschüssige Farbstoff wird durch mehrmaliges Waschen mit Aqua dest. entfernt. Dabei gehen allerdings geringe Mengen des Xylans (die wasserlöslichen Komponenten) verloren. Nach der enzymatischen Hydrolyse dieses Xylans entstehen kurzkettige, farbstoffsubstituierte Spaltprodukte, die in Lösung gehen. Nach Abzentrifugieren des ungelösten Xylans (15 Minuten, 32000 x g) wird die Blaufärbung des Überstandes bei 600 nm gemessen.

III. ERGEBNISSE

1a. Wachstum von *Trichosporon cutaneum* auf Xylan

Die Produktion von Xylanasen durch Hefen der Gattung *Trichosporon* beim Wachstum auf Xylan wurde erstmalig von Stevens und Payne (1977) erwähnt. Erste Versuche mit der Hefe *Trichosporon cutaneum* DSM 70698 zeigten, daß diese beim Wachstum in einem Minimalmedium (Abb. 6) mit 1 % Xylan als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle die Xylanase extrazellulär ins Medium ausscheidet. Als Kohlenstoffquelle im Kulturmedium wurde stets Haferspelzenxylan verwendet, das, wie mit Hilfe der Säurehydrolyse gezeigt wurde, 70 % Xylose, 17 % Glukose und 11 % Arabinose enthielt. Der relativ hohe Glukosegehalt deutet darauf hin, daß das Xylan mit anderen Glucanen (z.B. Cellulose) verunreinigt ist.

Die Bestimmung des Wachstums von *Trichosporon cutaneum* durch Trübungsmessung ist in frühen Wachstumsphasen schwierig, weil die Eigentrübung des Xylans stört. Erst gegen Mitte der exponentiellen Wachstumsphase kann die Eigentrübung durch die zur Messung nötige hohe Verdünnung des Kulturmediums ausgeschaltet werden. Da das Wachstum der Hefe auf Xylan in Submerskultur unter Bildung von Pseudomycel erfolgt, ist eine direkte Auszählung der Zellen nicht möglich. Deshalb wurde zur Bestimmung des Wachstums im Anfangsstadium auf die von Herbert et al. (1972) beschriebene Biuret-Reaktion zur Proteinbestimmung in ganzen Zellen zurückgegriffen. Zu den entsprechenden Proteinwerten wurde die optische Dichte anhand von gemessenen Trübungswerten aus einer späteren Wachstumsphase ermittelt (Tab. 1).

Kulturdauer (h)	Protein (mg/ml)	optische Dichte (600 nm)
4	0,05	0,17
8	0,17	0,57
12	0,34	1,15
15	0,54	1,83
18	1,01	3,42
21	1,30	4,4
24	1,39	4,7

Tab. 1: Zunahme von Zellprotein und optischer Dichte beim Wachstum von *Trichosporon cutaneum* in einem Minimalmedium mit 1 % Xylan als C-Quelle

Das Wachstum von *Trichosporon cutaneum* in einem Medium mit 1 % Xylan sowie der Xylanabbau und die damit verbundene Xylanaseproduktion sind in Abb. 6 dargestellt.
Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, wird Xylan innerhalb von 2 - 3 Tagen bis zu 70 % abgebaut. Dabei entstehen 2,6 g/l Biomasse mit einem Proteingehalt von 45 %. Der weitere Xylanabbau erfolgt nur noch sehr langsam, da mit abnehmender Kettenlänge des Xylans die Xylanaseaktivität sinkt. Selbst nach 17 Tagen Inkubationsdauer (nicht mit Diagramm gezeigt) ist noch etwa 12 % des Xylans vorhanden.

Der Xylanabbau konnte nach Hydrolyse der Kulturlösung über die Abnahme der verschiedenen Zucker im Xylan gemessen werden (Abb. 7, Tab.3). Das Chromatogramm zeigt, daß die Hefe alle Zuckerkomponenten verwerten kann. Die 4-O-Methyl-Glucuronsäure konnte mit diesem Trennsystem nicht nachgewiesen werden.

Abb. 6: Wachstum (▽—▽), Xylanabbau (o—o) und Xylanaseaktivität (●—●) von *Trichosporon cutaneum* in Abhängigkeit von der Kulturdauer.

	Units/mg Protein
Kulturfiltrat	4,7
Rohextrat	0,092
abzentrifugierte Zellbruchstücke	-

Tab. 2: Verteilung der β-Xylanaseaktivität in der Kultur von *Trichosporon cutaneum*.

Die beim Wachstum auf Xylan gebildete Xylanase wird fast vollständig extrazellulär ins Kulturmedium abgeschieden. Tabelle 2 zeigt, daß im Rohextrakt eine geringe Xylanaseaktivität festgestellt werden konnte. Diese ist möglicherweise auf Xylosidaseaktivität zurückzuführen. Die nach Zellaufschluß abzentrifugierten Zellbruchstücke zeigten keine Aktivität gegenüber Xylan. Dieser Befund zeigt, daß das Enzym nicht zellwandgebunden ist, wie bei der Hefe *Cryptococcus albidus* von Notario et al. (1979) beschrieben wurde.

Kulturdauer (Tage)	Xylose (%)	Arabinose (%)	Glukose (%)
0	70,47	11,57	14,42
3	23,49	4,28	5,03

Tab. 3: Abbau der Zuckerkomponenten des Haferspelzenxylans durch *Trichosporon cutaneum*. Wachstum 3 Tage bei 27 °C.

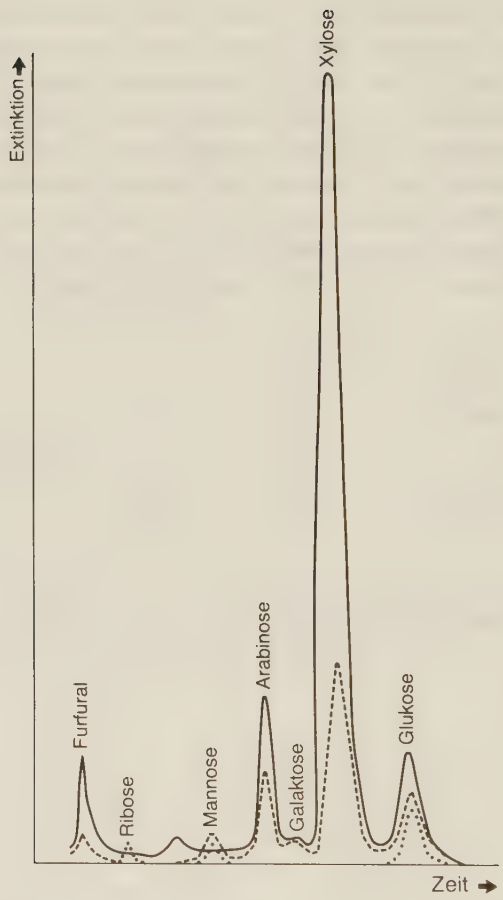


Abb. 7: Quantitative Zuckeranalyse des Haferspelzenxylans vor (——) und nach Wachstum (3 Tage) von *Trichosporon cutaneum* (---). Die Polysaccharide im Medium und in den Hefezellen (···) wurden mittels Schwefelsäure hydrolysiert und anschließend über einen Biotronik Sugar Analyzer bestimmt.

1b. Optimierung von Wachstumsparametern

In den folgenden Experimenten wurde zunächst der Einfluß der Inkubationstemperatur auf das Wachstum von *Trichosporon cutaneum* untersucht. Wie aus Abb. 8 hervorgeht, ist das Wachstum bei 27 °C und 30 °C gleich gut, während bei 37 °C viel schlechteres Wachstum stattfindet. Beim Wachstum auf Glukose erhielt man das gleiche Ergebnis.

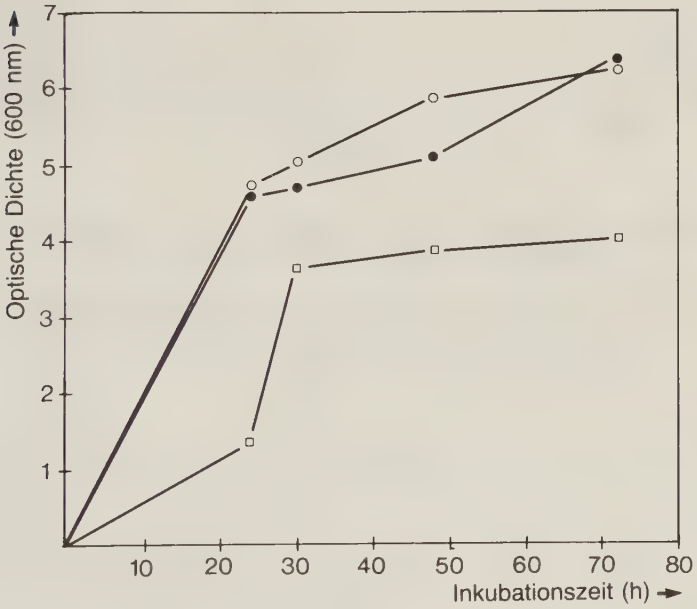


Abb. 8: Wachstumskurve bei verschiedenen Inkubationstemperaturen 27 °C (o—o); 30 °C (●—●); 37 °C (□—□).

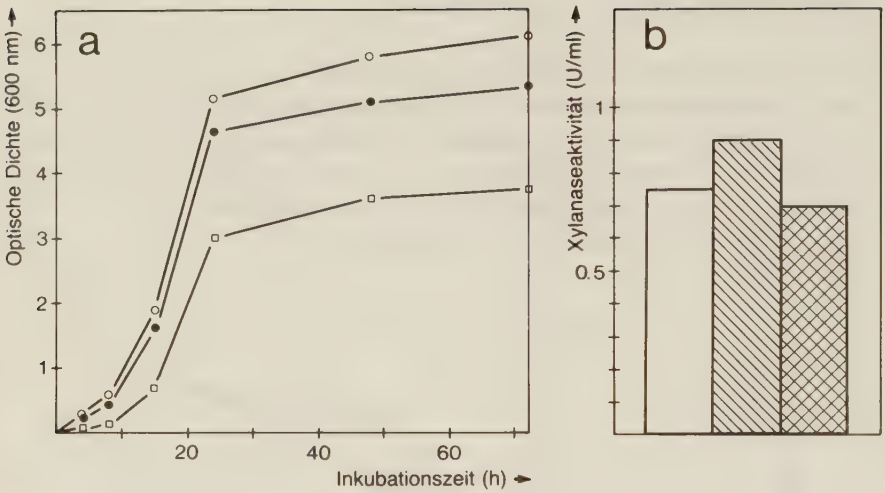


Abb. 9a: Wachstumskurve bei verschiedenem Anfangs-pH des Kulturmediums; pH 5 (o—o); pH 6 (●—●); pH 7 (□—□).

9b: Xylanaseaktivität im Kulturfiltrat von *Trichosporon cutaneum* nach Wachstum (3 Tage, 27 °C) auf Xylan bei verschiedenem Anfangs-pH des Kulturmediums; pH 5 (□); pH 6 (▨); pH 7 (▩).

Wie aus Abb. 9a ersichtlich ist, wächst die Hefe bei einem pH des Kulturmediums von 5 am besten. Da die Xylanaseaktivität im Kulturfiltrat bei pH 6 jedoch höher war (Abb. 9b), wurden weitere Kulturansätze zur Isolierung und Charakterisierung der Xylanasen bei pH 6 und bei einer Inkubationstemperatur von 27 °C durchgeführt.

Für diese Experimente wurden 0,02 % Hefeextrakt als Vitaminquelle eingesetzt. Thiamin (10 mg/l) und Biotin (1 mg/l) förderten zwar auch das Wachstum, Hefeextrakt war allerdings hinsichtlich der Xylanaseausbeute diesen beiden Vitaminen überlegen.

2. Wachstum und Xylanaseproduktion auf verschiedenen Substraten

Biely et al. (1980b) konnten zeigen, daß die Xylanase aus der Hefe *Cryptococcus albidus* induktiv gebildet wird. Notario et al. (1979) hingegen fanden eine konstitutive Xylanasebildung bei der Hefe *Cryptococcus albidus var. aerius*. Aus diesem Grunde wurde der Einfluß verschiedener C-Quellen auf das Wachstum und die Xylanaseproduktion von *Trichosporon cutaneum* untersucht.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 aufgeführt: Die Hefe synthetisiert das Enzym nur beim Wachstum auf Xylan, aber auch zu einem geringeren Teil (etwa 50 %) auf Xylose. Die Xylanase erweist sich somit als ein induktives Enzym.

C-Quelle	Wachstum (O.D.600 nm)		Xylanaseaktivität (U/ml)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Xylan	6,03	7,2	0,7	0,82
Xylose	7,95	9,5	0,44	0,45
Glukose	11,8	12,8	0	0
Cellobiose	12,96	13,4	0,05	0,06
Arabinogalactan	0,5	0,65	0	0
Galactomannan	0	0,2	0	0

Tab. 4: Wachstum und Xylanaseaktivität im Kulturfiltrat von *Trichosporon cutaneum* nach 24 und 48 Stunden Wachstum auf verschiedenen Substraten.

3. Isolierung der β-Xylanase

β-Xylanasen aus Pilzen sind schon wiederholt isoliert und charakterisiert worden (Hashimoto et al., 1971; Gorbacheva und Rodionova, 1977a; 1977b). Bei einigen Pilzen, wie z.B. *Aspergillus niger* van Tiegham (Takenishi und Tsujisaka, 1975) oder *Ceratocystis paradoxa* (Dekker und Richards, 1975a; 1975b), wurden mehrere Xylanasen gefunden. Die Hefe *Cryptococcus albidus* (Biely et al., 1980a) hingegen synthetisiert nur eine Xylanase, welche aus dem Kulturfiltrat isoliert wurde. Auch bei *Trichosporon cutaneum* konnte beim Wachstum auf Xylan nur

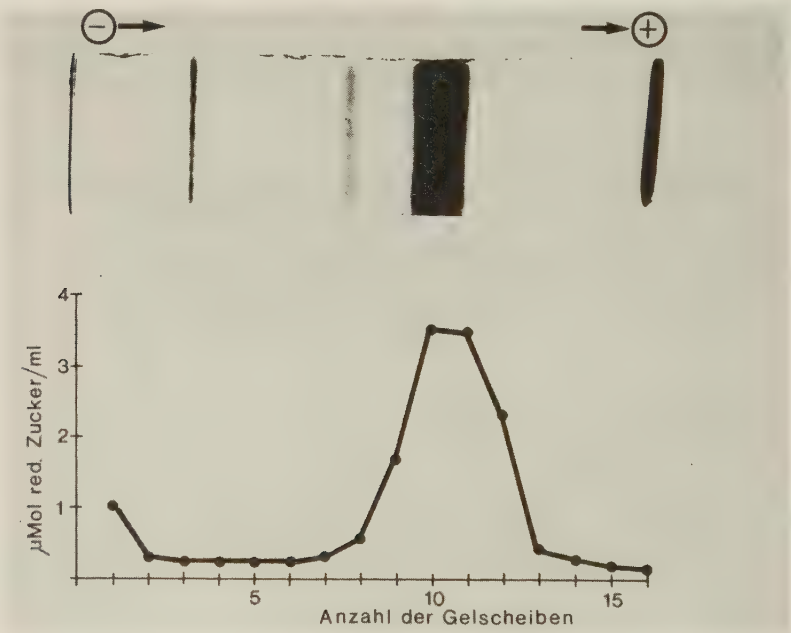


Abb. 10: Polyacrylamidgel-Elektrophorese (pH 8,9; 7 % Polyacrylamid) eines Kulturfiltrates von *Trichosporon cutaneum*. Nach Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde das Gel in Scheibchen geschnitten (5 x 10 mm) und diese mit 5 ml 1 % Xylanlösung (in 50 mM Acetatpuffer pH 5) 15 h bei 30 °C inkubiert. Die Menge an freigesetzten Zuckern wurde nach der Somogyi-Nelson-Methode bestimmt.

eine Xylanase identifiziert werden. Die extrazelluläre Xylanase erreicht ihr Aktivitätsmaximum in der stationären Wachstumsphase (Abb. 6). Zu diesem Zeitpunkt konnte im Kulturfiltrat nach elektrophoretischer Trennung eine besonders breite Proteinbande festgestellt werden (Abb. 10). Sie konnte nach Zerschneiden des Gels und anschließender Inkubation mit Xylan eindeutig als Xylanasebande identifiziert werden.

Eine nähere Charakterisierung dieser Xylanase erforderte eine Isolierung des Enzyms. Ausgangsmaterial für die Isolierung war das zellfreie Kulturfiltrat einer 3 Tage alten Kultur. Dieser Kultur wurde zusätzlich zum Xylan 0,1 % Glukose zugesetzt, was eine Erhöhung der Enzymausbeute um 35 % ergab. Das Kulturfiltrat wurde durch Ultrafiltration in einem Amicon Hollow-Fiber-System (Modell DC2, PM 5-Membran) bei 4 °C auf 1/10 des Anfangsvolumens konzentriert und anschließend im gleichen System gegen Kaliumphosphat-Puffer (0,01 M, pH 7) bis zum pH-Ausgleich dialysiert. Für die Aufbewahrung und Weiterverarbeitung dieses Kulturfiltrates waren Kenntnisse über eventuelle Proteaseaktivität wichtig. Mit Azocasein als Substrat konnte jedoch keine Proteaseaktivität nachgewiesen werden.

Als Nachteil beim Konzentrieren erwies sich die Zunahme der Viskosität des Kulturfiltrates durch extrazelluläre Polysaccharide (nicht verwertete Xylanbruchstücke). Zusätzlich trat beim Einengen eine tiefbraune Färbung ein, die vermutlich von phenolischen Körpern und Ligninresten herrührt, welche noch an das Xylan gebunden sein können (Smith, 1981). Wegen der Viskosität war eine Gelfiltration als erster Anreicherungsschritt ungeeignet, da mit dem viskosen Kulturfiltrat keine Auftrennung der Proteine erfolgte. Aus diesem Grund wurde das eingeengte Kulturfiltrat zur Anreicherung der Xylanase zunächst einer Anionenaustauschchromatographie unterzogen. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

a) DEAE-Cellulose-Chromatographie

Es wurden 144 ml des über Ultrafiltration eingeengten Kulturfiltrates auf eine DEAE-Cellulose-Säule gegeben und wie in 'Material und Methoden' beschrieben, chromatographiert.

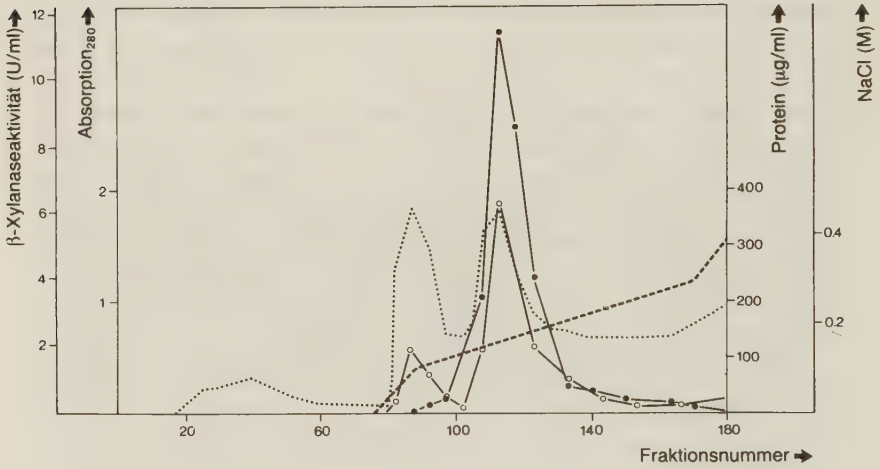


Abb. 11: DEAE-Cellulose Chromatographie des konzentrierten Kulturfiltrates von *Trichosporon cutaneum*. Die Xylanase wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten (0,12 - 0,25 M) eluiert. (···) Absorption bei 280 nm, (o—o) Protein, (●—●) Enzymaktivität, (---) NaCl-Gradient.

Abb. 11 zeigt das Elutionsmuster der getrennten Proteine. Mit dem Äquilibrierungspuffer wurde zunächst im Ultravioletlicht absorbierendes Material (Fraktionen Nr. 20 - 60) eluiert. In diesen Fraktionen konnte weder Protein noch Xylanaseaktivität gemessen werden; sie enthielten jedoch reduzierende Zucker, die nach der Methode von Somogyi und Nelson (1952; 1944) bestimmt wurden. Das gesamte Protein war am Ionenaustauscher gebunden. Mit einem linearen NaCl-Gradienten (0,1 - 0,3 M) konnte die Hauptmenge des Proteins

in 2 Peaks eluiert werden. Der erste Peak (Fraktion 82-97) enthielt nur wenig Protein, jedoch eine große Menge im UV-Bereich absorbierendes Material. Der größte Teil des Enzymproteins wurde in einem zweiten Proteinpeak mit einem NaCl-Gradienten von 0,12 - 0,25 M eluiert. Die Fraktionen mit Xylanaseaktivität (Nr. 97-162, 330 ml) wurden vereint und durch Ultrafiltration auf 45 ml eingeengt. Nach der DEAE-Cellulose-Chromatographie war das Protein von der Hauptmenge des begleitenden Materials (so von sämtlichen Farbstoffen) abgetrennt. Man erhielt eine klare, nicht mehr viskose Proteinlösung. Mit diesem Schritt wurde eine 2,8-fache Anreicherung bei einer Ausbeute von 64 % erzielt.

b) Gelfiltration an Biogel P-100

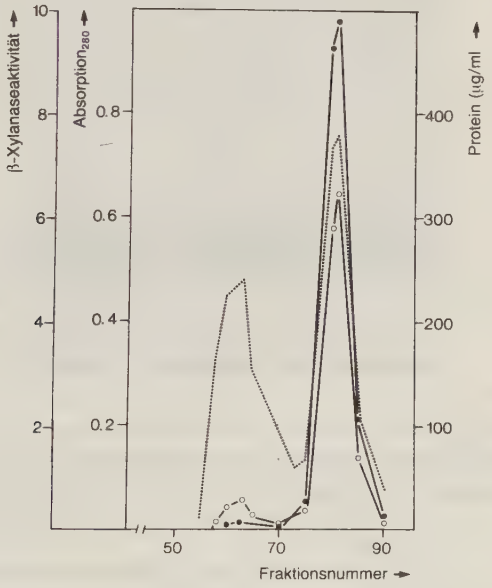


Abb. 12: Elutionsdiagramm der Gelfiltration an Biogel P-100. (···) Absorption bei 280 nm, (o—o) Protein, (●—●) Enzymaktivität

Diese konzentrierte Fraktion von der DEAE-Cellulose-Chromatographie wurde in 6 Portionen á 7 ml (6,1 mg Protein) auf eine Biogel P-100-Säule aufgetragen. Das Elutionsdiagramm (Abb. 12) zeigt 2 Proteinpeaks: der erste mit wenig Protein, obwohl viel Material eluiert wird, das bei 280 nm absorbiert (Fraktionen 57 -70), sowie ein zweiter grosser Proteinpeak, welcher die Xylanase enthielt. Die Fraktionen mit Xylanaseaktivität (Nr. 70 - 90) wurden vereint und gegen Acetatpuffer (0,05 M, pH 5) 24 h dialysiert.

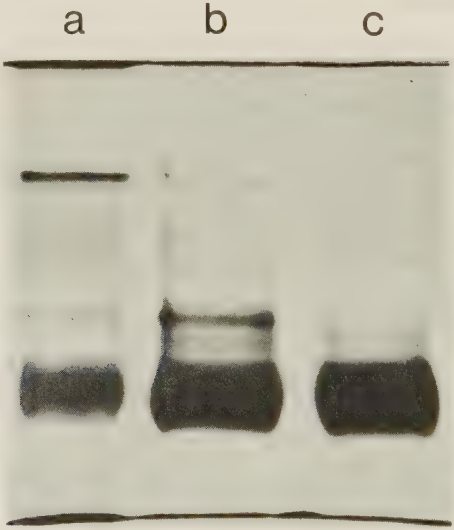


Abb. 13: Polyacrylamidgel-Elektrophoresemuster der β-Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* während der Reinigung aus dem Kulturfiltrat. Es wurden jeweils 80 µg Protein aufgetragen.
a: Gel-Elektrophorese des konzentrierten Kulturfiltrates
b: Gel-Elektrophorese nach DEAE-Cellulose-Chromatographie
c: Gel-Elektrophorese der gereinigten Xylanase nach Chromatographie an Biogel P-100.

Durch die Gelfiltration an Biogel P-100 konnte eine 3,7-fache Anreicherung der Xylanase aus dem Kulturfiltrat mit einer Ausbeute von 61 % erzielt werden. Dieser zweite Anreicherungsschritt erbrachte ein elektrophoretisch reines Enzym (Abb. 13, 14), das als einziger, symmetrischer Proteinpeak von einer Biogel P-100-Säule eluiert werden konnte.

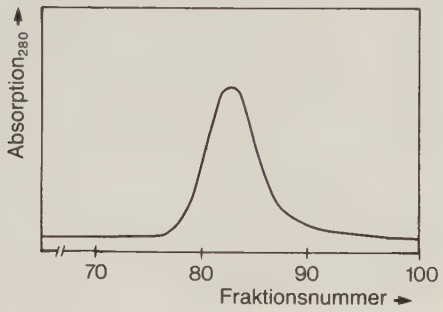


Abb. 14: Gelchromatographie der gereinigten Xylanase an Biogel P-100.

Die im Polyacrylamidgel gefärbte Proteinbande erwies sich eindeutig als die isolierte Xylanase (Abb. 15).
Die Ergebnisse der einzelnen Reinigungsschritte sind in Tab. 5 sowie in Abb. 13 zusammengefaßt.

Die dialysierte Enzymlösung wurde in Gegenwart von 0,02 % Natriumazid bei 4 ^{o}C aufbewahrt. Bei dieser Lagerung zeigte sich nach 6 Monaten noch kein Aktivitätsverlust. Einfrieren der Xylanaselösung bei -20 ^{o}C und Auftauen hatte einen Aktivitätsverlust von 30 % zur Folge.

Anreicherungsschritt	Volumen (ml)	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (U)	spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung
Kulturfiltrat	1480	154	1539	10	100	1
Konzentrierung durch Ultrafiltration	144	135	1224	9,1	80	0,9
DEAE-Cellulose (Fraktionen 97-162)	330	30,4	990	32,6	64	2,8
Biogel P-100 (Fraktionen 75-92)	45	25	941	37,6	61	3,7

Tab. 5: Isolierung der β-Xylanase aus dem Kulturfiltrat der Hefe *Trichosporon cutaneum*

Anreicherungsschritt	Volumen (ml)	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (U)	spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung
Kulturfiltrat	1660	259	1195	4,6	100	1
$(NH_4)_2SO_4$ Fraktion 85 % Sättigung	27	126	675	5,4	56	1,2
Präp. Polyacrylamidgel Elektrophorese	33	4	153	38	13	8

Tab. 6: Reinigung der β-Xylanase aus dem Kulturfiltrat der Hefe *Trichosporon cutaneum*

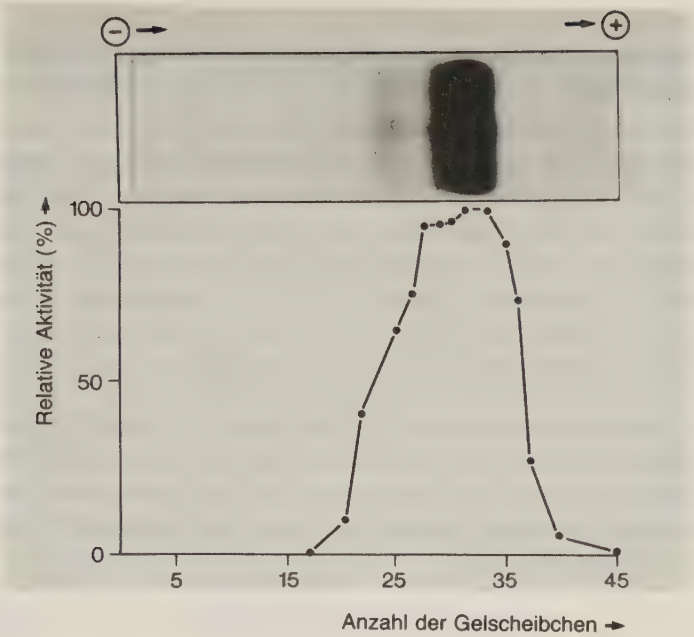


Abb. 15: Polyacrylamidgel-Elektrophorese (pH 8,9; 7 % Polyacrylamid) der gereinigten Xylanase. Pro Gelfraktion wurden 60 µg Protein aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde eine Gelfraktion zum Proteinnachweis gefärbt (oben), die andere wurde in parallele Scheibchen geschnitten (4 x 2 mm), diese 1 h mit einer 1 %-igen Xylanlösung (in 50 mM Acetatpuffer, pH 5) inkubiert. Anschließend wurden die freigesetzten reduzierenden Zucker nach Somogyi und Nelson bestimmt.

c) Ammoniumsulfatfällung und präparative Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Trennung der Proteine im Kulturfiltrat zeigte, daß die Xylanase (s. Abb. 10) den weitaus größten Teil der vorhandenen Proteine ausmacht. Da eine gute Auftrennung der Proteine erfolgte, wurde versucht, die Xylanase mit Hilfe einer präparativen Polyacrylamidgel-Elektrophorese zu reinigen. Durch Fällung mit Ammoniumsulfat bis zu 85 % Sättigung sollte eine Konzentrierung des Kulturfiltrats und eine erste Anreicherung erzielt werden.

Die Fällung wurde ähnlich wie von Bringer (1980) beschrieben, durchgeführt. Bei 0 °C wurde zum Kulturfiltrat unter leichtem Rühren langsam Ammoniumsulfat bis zur gewünschten Konzentration zugegeben. Diese Konzentration berechnet sich nach folgender Formel

$$\text{Gramm } (NH_4)_2SO_4 = \frac{1{,}77 \times V \times (S-s)}{3{,}54 - S}$$

V = Volumen der Lösung in ml

S bzw. s = gewünschte bzw. vorliegende Ammoniumsulfatsättigung bei 0 °C in Bruchteilen von 1

5 ml des durch Ammoniumsulfatfällung konzentrierten Kulturfiltrats wurden auf ein 5 mm dickes Gel aufgetragen und 7 h elektrophoretisch getrennt. Anschließend wurde die Xylanase aus dem Gel eluiert und im Eluat die Aktivität gemessen (Tab. 6).

Diese Methode führte auch zu einem elektrophoretisch reinen Enzym mit gleicher spezifischer Aktivität, wie man es nach DEAE-Cellulose-Chromatographie und Gelfiltration erhielt. Die Enzymausbeute hierbei war jedoch sehr gering.

Der hohe Verlust nach der Ammoniumsulfatfällung war darauf zurückzuführen, daß der Niederschlag nicht wieder vollständig in Lösung ging. Bei der Fällung können Polysaccharide in Form von nicht verwerteten höhermolekularen Xylooligosacchariden zusammen mit noch gebundenem Protein (Glykoproteine) ausflocken (Schmidt, persönl. Mitteilung), welche anschließed nicht wieder vollständig gelöst werden können.

Nach der Elektrophorese ließen sich nur noch etwa 20 % der aufgetragenen Enzymmenge eluieren. Dafür können mehrere Ursachen verantwortlich sein:

1. Die Trennung ist aufgrund der aufgetragenen großen Proteinmenge unzureichend, daher war ein sauberes Ausschneiden der Enzymbande aus dem Gel nicht möglich.
2. Ein Teil des Enzyms wird bei dieser Methode zerstört.

4. Charakterisierung der gereinigten β-Xylanase

a) Bestimmung des Molekulargewichts

Das Molekulargewicht des Enzyms wurde mit Hilfe der Gelfiltration bestimmt. Die Gelfiltration erfolgte an Biogel P-100 unter den beschriebenen Bedingungen. Aus der Eichkurve (Abb. 16) ließ sich anhand des Elutionsvolumens ein Molekulargewicht von 45 000 bestimmen.

Die Molekulargewichtsbestimmung über die Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von SDS führte zu einem ähnlichen Ergebnis. Wie aus Abb. 17 hervorgeht, konnte ein Molekulargewicht von 44 500 ermittelt werden. Da die Xylanase als einzelne Bande im SDS-haltigen Gelsystem wandert (Abb. 18) besteht sie vermutlich nur aus einer Polypeptidkette.

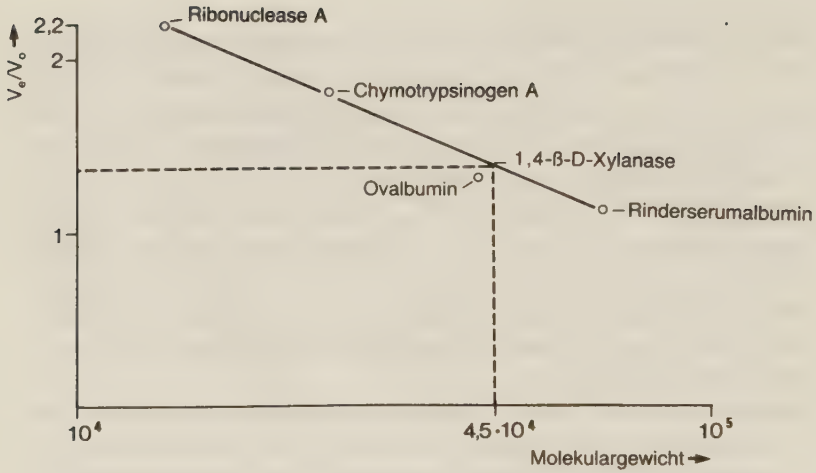


Abb. 16: Molekulargewichtsbestimmung der β-Xylanase durch Gelfiltration an Biogel P-100.

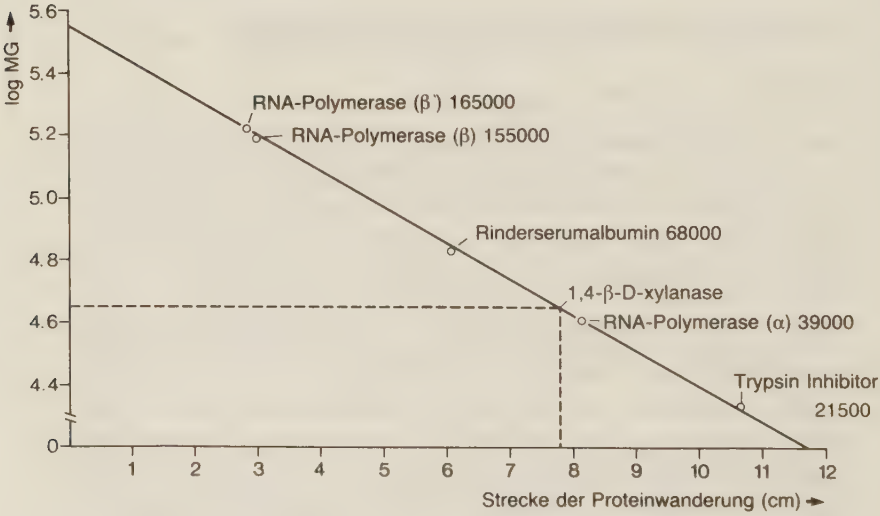


Abb. 17: Molekulargewichtsbestimmung der β-Xylanase durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von Natrium-Dodecylsulfat (Gelsystem nach Neville, 1971).

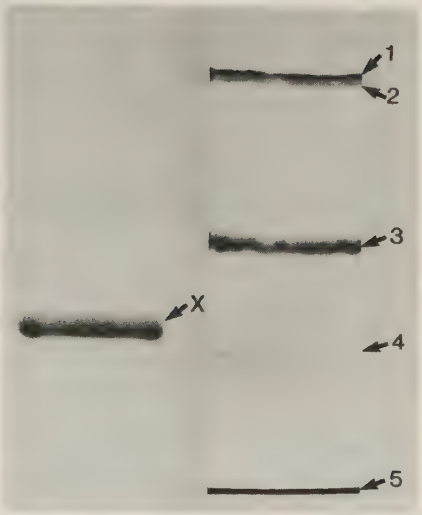


Abb. 18: Polyacrylamidgel-Elektrophorese der β-Xylanase von *Trichosporon cutaneum* in Gegenwart von SDS (Gelsystem nach Neville, 1971). β-Xylanase (X); RNA-Polymerase β', MG: 165 000 (1); RNA-Polymerase β, MG: 155000 (2); Rinderserumalbumin, MG: 68000 (3); RNA-Polymeraseα, MG: 39000 (4); Trypsin-Inhibitor, MG: 21500 (5).

b) Aminosäureanalyse

Tabelle 7 zeigt die Aminosäure-Zusammensetzung der β-Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* sowie die dreier Xylanasen aus Pilzen. Da die Molekulargewichte der aufgeführten Xylanasen stark voneinander abweichen (22000 - 45 000), wurde zum besseren Vergleich der Aminosäureverteilung in Tab. 7 auch der prozentuale Anteil der Aminosäuren, bezogen auf das Molekulargewicht, angegeben. Hieraus läßt sich erkennen, daß die Enzyme aus den Basidiomyceten *Stereum sanguinolentum* und *Schizophyllum commune* ähnliche Zusammensetzungen haben. Die Xylanase

Aminosäure	*Trichosporon cutaneum* Rest/4500		*Aspergillus niger* Rest/22000		*Stereum sanguinolentum* Rest/23900		*Schizophyllum commune* Rest/33000	
	Rest	%	Rest	%	Rest	%	Rest	%
Asparaginsäure	54	13,1	30	14,2	19	8,7	32	10,7
Threonin	25	6,1	32	15,1	27	12,4	30	10,1
Serin	30	7,3	28	13,2	34	15,6	38	12,8
Glutaminsäure	55	13,3	17	8,0	15	6,9	19	6,4
Prolin	17	4,1	5	2,4	11	5,1	14	4,7
Glycin	47	11,4	36	17,0	26	11,9	47	15,8
Alanin	44	10,7	13	6,1	18	8,3	21	7,1
Halb-Cystin	3	0,7	Spuren		3	1,4	4	1,3
Valin	24	5,8	1	0,5	13	6,0	14	4,7
Methionin	6	1,5	2	0,9	2	0,9	2	0,7
Isoleucin	17	4,1	5	2,4	7	3,2	12	4,0
Leucin	26	6,3	5	2,4	8	3,7	11	3,7
Tyrosin	17	4,1	16	7,6	11	5,1	23	7,7
Phenylalanin	9	2,2	5	2,4	7	3,2	5	1,7
Lysin	19	4,6	6	2,8	4	1,8	7	2,4
Histidin	11	2,7	2	0,9	2	0,9	4	1,3
Arginin	9	2,2	6	2,8	2	0,9	6	2,0
Tryptophan	n.b.		3	1,4	9	4,1	9	3,0

Tab. 7: Vergleich der Aminosäure-Zusammensetzung der β-Xylanase aus *Trichosporon cutaneum*, *Aspergillus niger* (Gorbacheva und Rodionova, 1977), *Stereum sanguinolentum* (Eriksson et al., 1971) und *Schizophyllum commune* (Paice et al., 1978).

aus der Hefe *Trichosporon cutaneum* unterscheidet sich von diesen Enzymen durch einen deutlich höheren Anteil an den Aminosäuren Glutaminsäure, Leucin, Lysin und Histidin und einen geringeren Anteil an Threonin und Serin. Die Xylanase aus dem Ascomyceten *Aspergillus niger* zeigt sowohl Unterschiede zu den Enzymen der beiden Basidiomyceten, als auch zu der Xylanase aus *Trichosporon cutaneum*.

c) Temperaturstabilität

Zur Untersuchung der Temperaturstabilität wurde das Enzym (21 µg/ml) in Acetatpuffer (0,05 M, pH 5) bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich lange vorinkubiert. Anschliessend wurde die Restaktivität unter Standardbedingungen bestimmt. Wie aus Abb. 19 hervorgeht, beeinflußt eine einstündige Vorinkubation des Enzyms bei 35 °C und darunter die Enzymaktivität nicht. Die Aktivität verringert sich jedoch rapide bei Temperaturen über 40 °C.

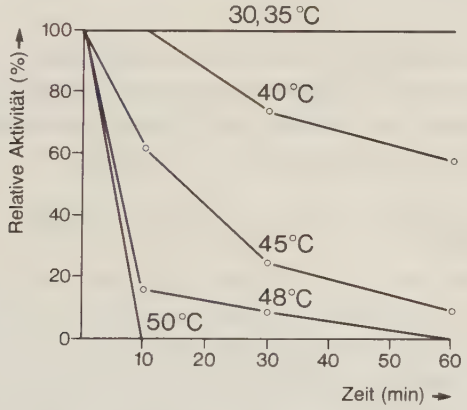


Abb. 19: Temperaturstabilität der gereinigten β-Xylanase. Das Enzym (21 µg Protein/ml) in 50 mM Acetatpuffer, pH 5, wurde bei verschiedenen Temperaturen 10, 30 und 60 min lang erhitzt, und anschließend wurde die Aktivität unter Standardbedingungen gemessen.

So wurde bei 45 °C und 30-minütiger Vorinkubation nur noch 25 % der ursprünglichen Aktivität gemessen. Bei 50 °C wurde das Enzym bereits nach 10 Minuten Vorinkubation völlig inaktiviert.

Für die Verwendung der Xylanase zum enzymatischen Xylanabbau waren Kenntnisse über die Inaktivierung des Enzyms während einer längeren Inkubationszeit bei 30 °C erforderlich. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 dargestellt.

Zeit (Tage)	Aktivitätsverlust (%)
1	14
2	25
3	34
7	55

Tab. 8: Temperaturstabilität der Xylanase von *Trichosporon cutaneum* bei 30 °C.

Bei Temperaturen bis 30 °C ist das Enzym relativ stabil. Eine von Dekker et al. (1975) beschriebene Xylanase aus *Ceratocystis paradoxa* verlor über 80 % der ursprünglichen Aktivität nach einer Inkubationszeit länger als 4 h.

d) Temperaturoptimum

Für die Xylanase aus dem Kulturfiltrat der Hefe *Cryptococcus albidus var. aerius* (Notario et al., 1979) sowie für einige Pilzxylanasen (Gorbacheva und Rodionova , 1976) wurde ein Temperaturoptimum von 50 °C beschrieben. Ein ungewöhnlich hohes Temperaturoptimum von 80 °C wurde für die Xylanaseaktivität von *Ceratocystis paradoxa* ermittelt (Dekker und Richards, 1975b).

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* wurde die Enzym-Substrat-Lösung bei unterschiedlichen Temperaturen 10 Minuten inkubiert und anschließend die freigesetzten reduzierenden Zucker nach der Methode von Somogyi und Nelson (1952, 1944) bestimmt. Abb. 20 zeigt ein Temperaturoptimum von 50 °C.

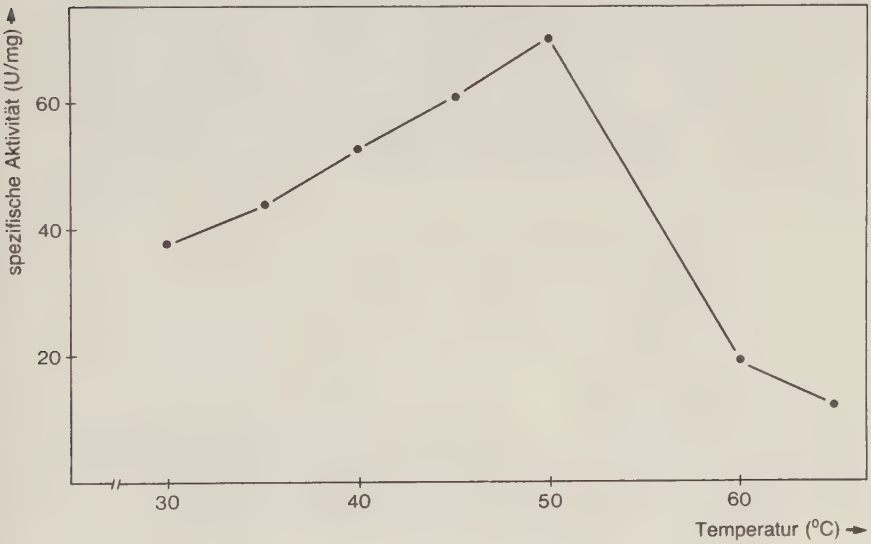


Abb. 20: Temperatur-Optimumskurve der gereinigten β-Xylanase von *Trichosporon cutaneum*.

e) pH-Stabilität

Der pH-Bereich, in dem Xylanasen stabil sind, ist bei einigen Bakterien gering. So ist die Xylanase aus *Bacillus subtilis* nur zwischen pH 5 - 7 stabil (Takahashi und Hashimoto, 1963), die aus *Streptomyces xylophagus* zwischen pH 5,3 - 7,3 (Iizuka und Kawaminami, 1965). Dem gegenüber scheint der Stabilitätsbereich bei Xylanasen aus Pilzen größer zu sein. Inoue et al. (1970a) beschreiben eine Xylanase aus *Aspergillus*

niger, die in einem Bereich von pH 2 - 9 stabil bleibt, die Xylanase aus *Trichoderma viride* (Hashimoto et al., 1971) behält die Aktivität zwischen pH 2 - 7. Einige Pilz-Xylanasen sind noch bei pH-Werten über 9 stabil (Fukumoto et al., 1970; Dekker und Richards, 1975b).

Bei der Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* wurde die pH-Stabilität in einem pH-Bereich zwischen 3 und 11 getestet. Dazu wurde die Enzymlösung (0,105 mg Protein/ml) mit entsprechendem Puffer durch 1:10 Verdünnungen auf den gewünschten pH gebracht und 1 h bei 30 °C inkubiert. Die Aktivität dieser vorinkubierten Proben wurde anschließend unter Standardbedingungen gemessen (20 Min., pH 5). Es wurden folgende Puffer in einer 0,05 M Konzentration verwendet:

Na-Formiat/Ameisensäure	für	pH 3 - 3,5
Acetat	für	pH 4 - 5,5
K-Phosphat	für	pH 6 - 7,5
Tris/HCl	für	pH 8 - 8,5
Glycin/NaOH	für	pH 9 - 11

Aus Abb. 21 geht hervor, daß die Xylanaseaktivität zwischen pH 4,5 - 9 konstant bleibt. Dieser Stabilitätsbereich ist im Vergleich zu Xylanasen aus Bakterien sehr groß.

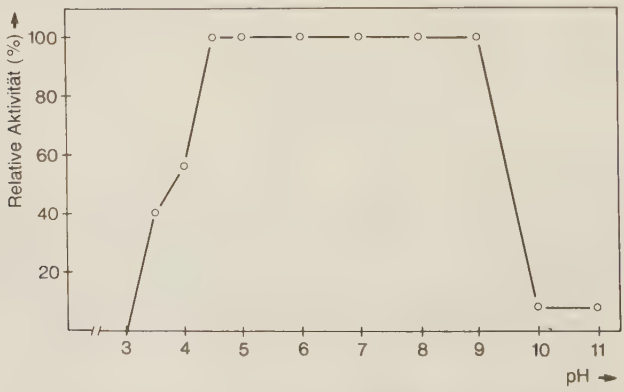


Abb. 21: Einfluß des pH auf die Enzymstabilität der gereinigten β-Xylanase von *Trichosporon cutaneum*.

f) pH-Optimum

Für die Xylanase aus *Bacillus subtilis* ist ein pH-Optimum von 6 - 6,2 (Takahashi und Hashimoto, 1963), für die aus *Streptomyces xylophagus* eines von 6,2 beschrieben worden (Iizuka und Kawaminami, 1965). Bei Pilz-Xylanasen wurden im allgemeinen etwas niedrigere pH-Optima (4 - 5) ermittelt (Gorbacheva und Rodionova, 1977; Dekker und Richards, 1975). Die von Biely et al. (1980) aus der Hefe *Cryptococcus albidus* isolierte Xylanase zeigte optimale Aktivität bei pH 5,4.
Abb. 22 zeigt die Aktivität der Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* als Funktion des pH der Substratlösung. Das Enzym hat ein breites pH-Optimum, das zwischen pH 4,5 und 5,5 liegt.

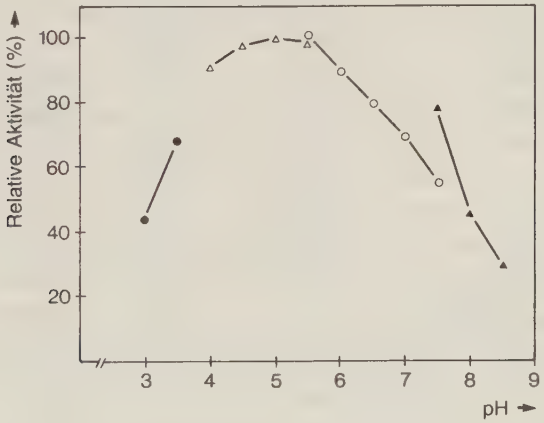


Abb. 22: pH-Optimumskurve der gereinigten β-Xylanase. Natriumformiat/Ameisensäure-Puffer 0,05 M (●—●), Acetatpuffer 0,05 M (▽—▽), Kalium-Phosphat-Puffer 0,05 M (○—○), Tris-HCl 0,05 M (▼—▼).

g) Einfluß von Inhibitoren

1. Metallionen

Folgende Metallionen wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Xylanaseaktivität untersucht: Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+} (als Sulfat), Ca^{2+} ($CaCl_2$), sowie p-Chlormercuribenzoesäure und EDTA. Die Salze wurden vor dem Enzymtest zu der Substratlösung (1 % Xylan in 0,05 M Acetatpuffer pH 5) in einer Konzentration von 2 mM und 10 mM zugegeben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengestellt:

Ionen	Restaktivität (%)	
	2 mM	10 mM
-	100	100
PCMB	94	95
Fe^{2+}	77	n.b.
Cu^{2+}	100	81
Zn^{2+}	100	87
Mg^{2+}	100	100
Ca^{2+}	100	100
EDTA	100	100
NaN_3	100	100
p-Chlormercuribenzoesäure	100	n.b.

Tab. 9: Einfluß von Metallionen auf die β-Xylanase aktivität von *Trichosporon cutaneum*. n.b. = nicht bestimmt.

Von den untersuchten Metallionen zeigte Fe^{2+} bei einer Konzentration von 2 mM einen geringen inhibitorischen Effekt. Wegen erheblicher Störung beim Nachweis der reduzierenden Zucker (Somogyi und Nelson, 1952, 1944) konnte bei einer Konzentration von 10 mM Fe^{2+} kein Meßwert ermittelt werden. Bei hoher Ionenkonzentration hemmten außerdem Zn^{2+} und Cu^{2+} geringfügig die Enzymaktivität.

Das Sulfhydryl-Reagenz PCMB (Boyer, 1954) hat keinen inhibitorischen Einfluß auf die Xylanaseaktivität. Dieser Befund deutet darauf hin, daß im aktiven Zentrum des Enzyms entweder keine Cysteinreste vorliegen oder Cysteinreste nicht für die Aufrechterhaltung der aktiven Struktur des Enzyms nötig sind (Webb, 1966). Da die Xylanaseaktivität durch EDTA nicht beeinflußt wird, sind Metallionen für die Aktivität des Enzyms offenbar nicht essentiell. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Gorbacheva und Rodionova (1977) bei einer Xylanase aus *Aspergillus niger str. 14*, sowie Dekker und Richards (1975), die eine Xylanase aus dem Kulturfiltrat von *Ceratocystis paradoxa* untersuchten.

2. Zucker

Dekker und Richards (1975a, 1975b) beschreiben eine Produktinhibition der Xylanase von *Ceratocystis paradoxa* durch Xylose. Aufgrund dieses Befundes wurde der Einfluß von Xylose, Glukose und Cellobiose auf die Aktivität der Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* untersucht (Tab. 10). Die Kapazitätsgrenze der Somogyi-Nelson-Methode zum Nachweis reduzierender Zucker liegt unterhalb der hier verwendeten Zuckerkonzentration, weshalb der Xylanabbau mit dieser Methode nicht erfaßt werden konnte. Deswegen wurde mit Remazolbrillantblau-R gefärbtes Xylan als Substrat verwendet.

Zuckerkonz. (g/l)	Xylose (E_{600})	Glukose (E_{600})	Cellobiose (E_{600})
0	0,178	0,174	0,183
2,5	0,17	0,166	0,193
5	0,165	0,192	0,187
10	0,177	0,18	0,168
20	0,17	0,18	0,14
30	0,17	0,19	0,13
40	0,164	0,185	0,127
50	0,17	0,18	0,12

Tab. 10: Einfluß verschiedener Zucker auf die Aktivität der Xylanase von *Trichosporon cutaneum*. Die Extinktion des Überstands nach Abzentrifugieren des ungelösten Xylans wurde bei 600 nm gemessen.

Wie aus Tab. 10 hervorgeht, haben Xylose und Glukose keinen inhibitorischen Einfluß auf die Xylanaseaktivität. Cellobiose hemmt geringfügig ab einer Konzentration von 10 g/l die Enzymaktivität.

h) Bestimmung von K_M und V_{max}

Um eine Vorstellung über die Affinität der Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* zum Xylan im Vergleich zu anderen gereinigten Xylanasen zu bekommen, wurde in Versuchen mit steigender Substratkonzentration der K_M-Wert ermittelt. Hierbei muß berücksichtigt werden, daß die Bestimmung der Michaelis-Menten Konstanten bei Cellulasen und Hemicellulasen problematisch ist, weil die Substrate nicht einheitlich sind. Da zudem die verschiedenen Autoren unterschiedliche Bedingungen für Kultur und Enzymtest wählen, ist ein direkter Vergleich der ermittelten Werte schwierig.

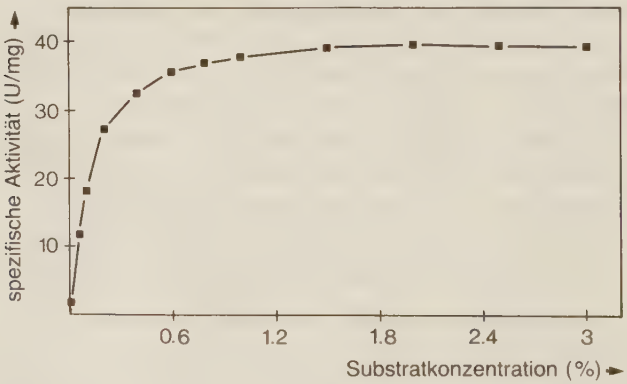


Abb. 23: Michaelis-Menten-Beziehung für die gereinigte β-Xylanase bei Reaktion mit Haferspelzenxylan.

Aus der Michaelis-Menten-Beziehung (Abb. 23) konnte für die Xylanase ein K_M-Wert von 1,1 mg Xylan pro ml und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 39,5 µmol reduzierende

Zucker (bezogen auf Xylose) pro mg Enzym pro Minute ermittelt werden.

Aus den Koordinatenschnittpunkten im Lineweaver-Burk Diagramm (Abb. 24) wurde zum Vergleich ein K_M-Wert von 1,5 mg Xylan/ml und V_{max} von 43,5 µmol red. Zucker/mg Enzym pro Minute errechnet (Lineweaver und Burk, 1934).

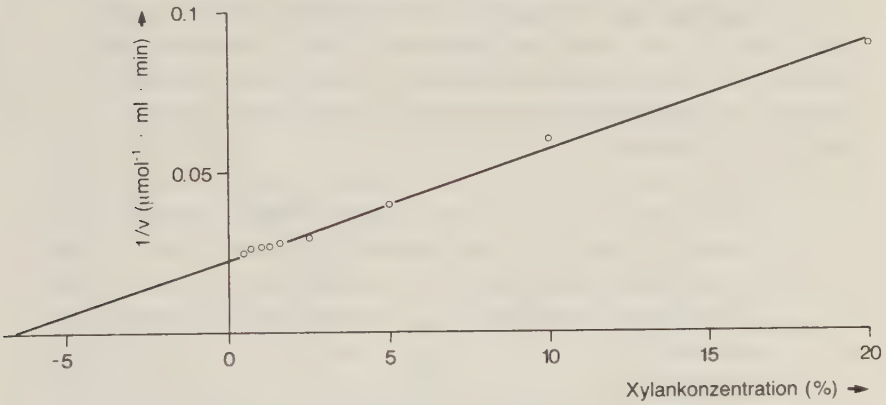


Abb. 24: Lineweaver-Burk-Diagramm für die gereinigte β-Xylanase.

i) Substratspezifität

Bei einigen Xylanasen wurde eine geringe Affinität zur Cellulose gefunden. So wiesen Dekker und Richards (1975b) mit der gereinigten Xylanase (Hemicellulase II) aus *Ceratocystis paradoxa* und Takahashi und Kutsumi (1979) mit der Xylanase aus *Gliocladium virens* geringe Cellulase-Aktivitäten nach. Hrazdina und Neukom (1966) isolierten aus einem kommerziellen Cellulasepräparat eine Xylanase, die ebenfalls schwache cellulolytische Aktivität hatte. Biely et al. (1980a) jedoch konnten der gereinigten Xylanase aus der Hefe *Cryptococcus albidus* keine Cellulase-Aktivität zuordnen. Andererseits wurden bei gereinigten Cellulasen gleichzeitige Xylanase-

Aktivitäten beschrieben. Toda et al. (1971) reinigten eine Cellulasefraktion (F-2) aus *Trichoderma viride*, welche Xylanase-Aktivität aufwies. Die beiden Aktivitäten konnten durch chromatographische Verfahren nicht voneinander getrennt werden. Ähnliches fanden Sobczak und Urbanek (1981) bei einer Enzymfraktion von *Fusarium avenaceum*.

In folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die gereinigte Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* cellulolytische Aktivität zeigt. Der Enzymtest wurde wie unter 'Material und Methoden' beschrieben durchgeführt, wobei Xylan durch Cellulose als Substrat ersetzt wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Substrat	Xylanase-Aktivität (U/mg)
Xylan (Kontrolle)	37,8
Carboxymethylcellulose	0,12
Avicel	0
Solka Floc	0,3

Tab. 11: Aktivität der gereinigten Xylanase gegenüber verschiedenen Cellulosepräparaten. Inkubation: 1 h bei 30 °C.

Die Tabelle zeigt, daß Avicel (kristalline Cellulose) von der Xylanase nicht angegriffen wird. Für die mit CMC und Solka Floc gefundenen sehr geringen Enzym-Aktivitäten gibt es 2 Erklärungsmöglichkeiten:
(1) Wegen des nur geringen Unterschiedes in der Molekülstruktur zwischen Xylan und Cellulose ist eine Affinität der Xylanase zu diesen Substraten denkbar (Sørensen, 1957).
(2) Die Substrate enthalten Xylan oder Xylooligosaccharide als Verunreinigung. Für CMC und Avicel wird ein Xylananteil von 18 % bzw. 5 % (Lynch et al., 1980) und für Solka Floc von 10 % (Cooney et al., 1978) angegeben. Es ist anzunehmen, daß die mit diesen Cellulosesubstraten gefundenen Enzym-Aktivitäten auf der Umsetzung der Xylananteile beruhen.

j) Untersuchungen zum Glykoproteincharakter der β-Xylanase

Während Cellulasen häufig als Glykoproteine beschrieben werden (Toda et al., 1971; Dekker et al., 1976), liegen bei Xylanasen darüber noch wenige Ergebnisse vor. Erste Hinweise dafür, daß es sich bei der Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* um ein Glykoprotein handeln könnte, ergab die Gelelektrophorese mit anschließender Glykoprotein-Färbung nach der Methode von Zacharius und Zell (1969). Nach der Färbung erhielt man eine rot gefärbte Proteinbande, was auf das Vorhandensein von Kohlenhydraten schließen ließ.

Zur genaueren Charakterisierung des Glykoproteincharakters wurde die Xylanase hydrolysiert (s. II. 9) und die Hydrolyseprodukte mittels Ionenaustauschchromatographie (Biotronik Sugar Analyzer) qualitativ und quantitativ bestimmt. Abb. 25 zeigt das Elutionsdiagramm der hydrolysierten Xylanlösung. Der Kohlenhydratanteil (aus Eichkurven mit den verschiedenen Zuckern ermittelt) des Enzyms setzte sich zusammen aus den Zuckern: Xylose, Galaktose, Arabinose, Mannose, Rhamnose und geringe Mengen Glukose in einem Verhältnis 1:0,8:0,62:0,85:0,25:0,11. Obwohl des Verhältnis der Zucker untereinander fast gleich blieb, war bei unterschiedlichen Xylanasehydrolysen die gemessene Kohlenhydratmenge stets verschieden; sie schwankte in den Versuchen zwischen 17 % und 32 %. Da die Glykoproteinhydrolysate (vor allem Pentosen) durch Einwirkung von anorganischen Säuren zerstört werden können, wurde eine Zuckerkontrollösung mit einer Zuckerkonzentration im Bereich der in den Enzympräparaten vorliegenden Menge hydrolysiert. Nach dieser Hydrolyse traten keine Verluste auf. Deshalb konnten Hydrolyseverluste als Grund für die schwankenden Zuckerkonzentrationen in Xylanasehydrolysaten ausgeschlossen werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse mußte geprüft werden, ob die Kohlenhydrate nur an das Enzym adsorbiert sind und nach entsprechender Behandlung abdissoziieren können, oder ob sie

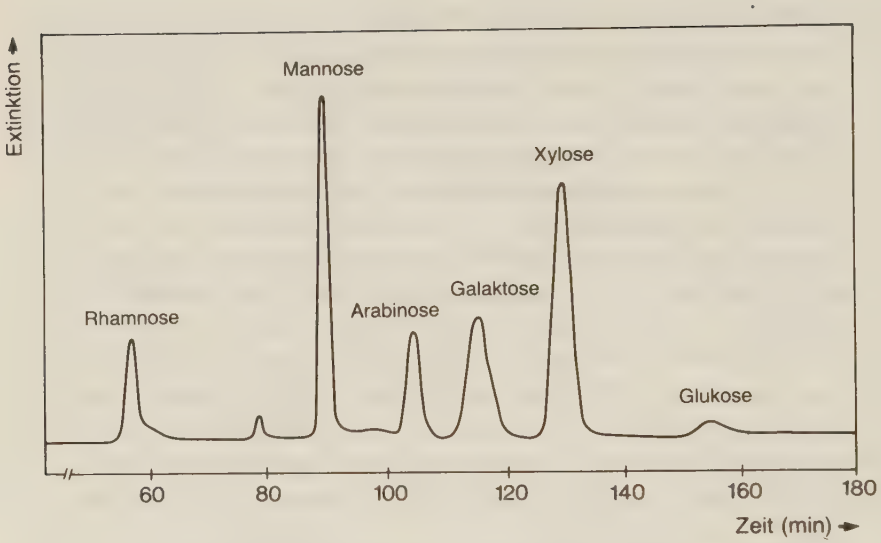


Abb. 25: Elutionsdiagramm der hydrolysierten Xylanaselösung von *Trichosporon cutaneum* nach Trennung an einem Anionenaustauscherharz.

kovalent gebunden sind, wie es für Glykoproteine charakteristisch ist (Schmid, 1964; Spiro, 1970). Paice et al. (1978) hatten bei der Xylanase aus *Schizophyllum commune* ähnliche Beobachtungen gemacht. Sie konnten zeigen, daß nach Behandlung des Enzyms mit SDS, bei der die Polypeptidketten entfaltet werden, die Zucker abdissoziierten. Daraus schlossen sie, daß diese lediglich in die Peptidketten eingelagert und nicht kovalent gebunden waren.

Mit der Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* wurden gleiche Untersuchungen durchgeführt. Das Enzym wurde 5 Minuten bei 100 ^{o}C in Gegenwart von 1 % SDS (pH 7) erhitzt, dialysiert, um eventuell abdissozierte Zucker zu entfernen, und anschließend wie unter 'Material und Methoden' beschrieben, hydrolysiert. Hierbei zeigte sich, daß über 95 % der Kohlenhydrate vom Enzym abgetrennt wurden (Tab. 12).

Zucker	unbehandeltes Enzymhydrolysat (mg Zucker/ml)	mit SDS behandeltes Enzymhydrolysat (mg Zucker/ml)
Rhamnose	0,028	0,0032
Mannose	0,08	0,0074
Arabinose	0,055	0,0043
Galaktose	0,088	0,0095
Xylose	0,11	0,0183
Glukose	0,0135	0
gesamt:	0,389	0,026

Tab. 12: Zusammensetzung des Kohlenhydratanteils der Xylanase von *Trichosporon cutaneum* vor und nach der SDS-Behandlung des Enzyms.

Um abzusichern, daß die Zucker nur adsorbiert waren, wurde ein Kontrollversuch mit einem bekannten Glykoprotein von Behring (sa_1 Op Nr. 8376) durchgeführt. Bei diesem Versuch blieben die Zucker an dem Protein gebunden, was auf eine kovalente Bindung zwischen Kohlenhydratanteil und Protein schließen ließ.

5. Untersuchungen zum enzymatischen Xylanabbau

a) Enzymatische Xylanhydrolyse in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Biely et al. (1980a) fanden bei der Hydrolyse von Xylan durch die Xylanase von der Hefe *Cryptococcus albidus* eine Linearität zwischen der Menge an freigesetzten reduzierenden Zuckern und der Inkubationszeit solange, bis etwa 0,2 µmol Zucker vom Substrat abgespalten worden waren. Solche proportionale Abhängigkeit konnte allerdings bei einigen Xylanasen nicht nachgewiesen werden (Rickard und Laughlin, 1980; Fukui, 1958), so auch bei der Xylanase aus *Trichosporon cutaneum*. Verfolgt man den enzymatischen Xylanabbau (in Form der freigesetzten reduzierenden Zucker) nach verschiedenen Zeiten,

dann erhält man einen Kurvenverlauf, wie er in Abb. 26 dargestellt ist. Die Zahl der freigesetzten reduzierenden Zukker nahm nicht proportional zur Inkubationszeit zu bzw. die Zunahme der Zucker pro Minute sank mit fortschreitender Inkubationsdauer. Dies kann dadurch erklärt werden, daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit abnehmender Kettenlänge des Xylans (Sinner, 1975; Howard et al., 1960) sehr schnell abnimmt (Abb. 27). Wie aus der Abbildung deutlich zu erkennen ist, hat dies Folgen für die Definition der Xylanaseaktivität. Je nach Definition erhält man eine um so höhere Enzymaktivität, je kürzer man die Inkubationszeit wählt.

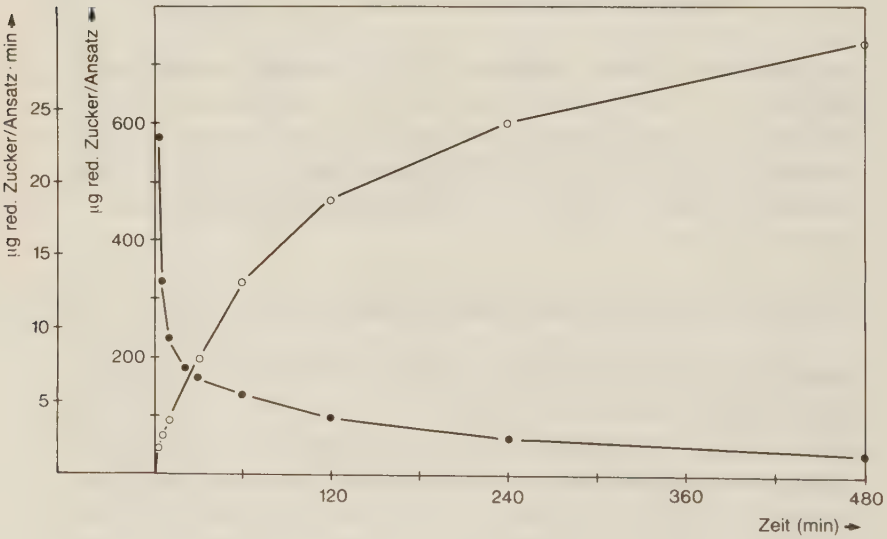


Abb. 26: Xylanhydrolyse in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Ansätze enthielten 4,5 ml 1 %-ige Xylanlösung (in 50 mM Acetatpuffer, pH 5), 0,3 ml Enzymlösung (21 µg/ml) und 0,2 ml 50 mM Acetatpuffer, pH 5. Die Inkubationstemperatur betrug 30 °C. Gemessen wurden die freigesetzten reduzierenden Zukker (in µg) pro Ansatz (o—o) sowie die Menge an freigesetzten reduzierenden Zuckern pro ml Ansatz pro min (●—●).

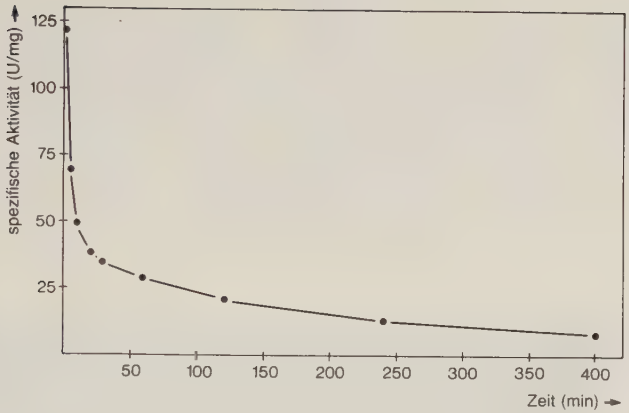


Abb. 27: Aktivität der gereinigten Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* als Funktion der Inkubationsdauer.

b) Spaltungsmuster der Xylanase bei Inkubation mit Xylan

Die Mehrheit der bisher bekannten β-Xylanasen (aus Pilzen und Bakterien) zeigen Endoenzym-Charakter, d.h. sie spalten Xylan in der Mitte des Moleküls. Dabei entstehen zunächst höhere Oligosaccharide, die anschließend weiter hydrolysiert werden zu den Hauptendprodukten Xylose, Xylobiose und Xylotriose, wobei mengenmäßig die Xylobiose überwiegt. Xylobiose wird von der Xylanase nicht gespalten (Horikoshi und Atsukawa, 1973; Gorbacheva und Rodionova, 1977). Die bisher bei Hefen untersuchten Xylanasen hydrolysierten Xylan ebenfalls nach dem Muster eines Endoenzyms (Biely et al., 1980a; Notario et al., 1979), Ob dies auch für die Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* zutraf, sollte in Versuchen zur enzymatischen Hydrolyse von Haferspelzen-, Buchen- und Lärchenxylan geklärt werden. Dazu wurde eine 2 %-ige Xylanlösung (w/v) (in Aqua dest. pH 5) mit gereinigtem Enzym (0,05 Units/mg Xylan) bei 30 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Reaktion durch Erhitzen des Ansatzes (10 min, 100 °C) be-

endet. Nachdem das unlösliche Xylan abzentrifugiert worden war (15 min, 32000 x g), konnten die Abbauprodukte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie analysiert werden. Abb. 28 zeigt, daß die Xylanase zu Beginn der Reaktion aus Haferspelzenxylan zunächst Xylooligosaccharide freisetzt. Mit fortschreitender Inkubationszeit häufen sich die Hauptendprodukte Xylobiose und Xylose an.

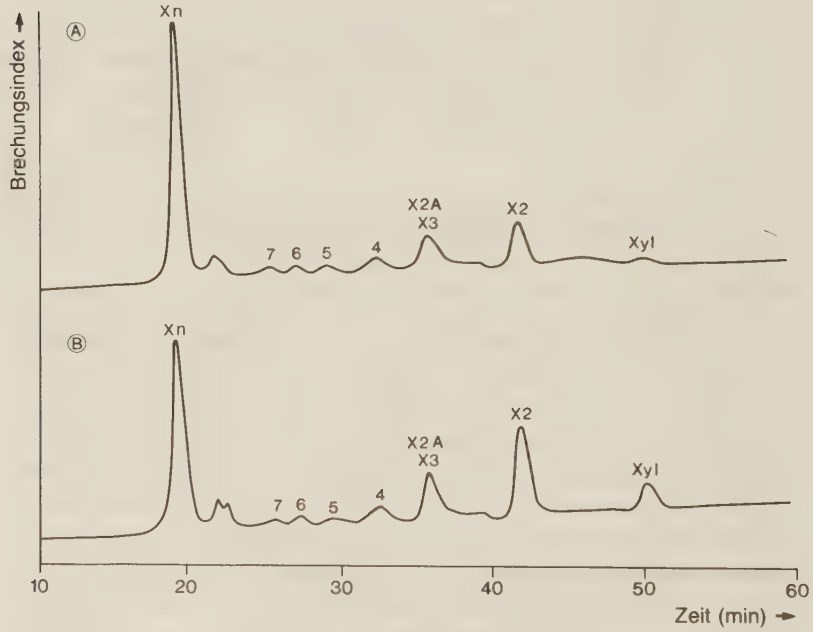


Abb. 28: Enzymatische Hydrolyse von Haferspelzenxylan durch die Xylanase aus *Trichosporon cutaneum*, und Analyse der Abbauprodukte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Xylan (20 mg/ml in Aqua dest., pH 5) wurde mit Enzymlösung (0,05 U/mg Xylan) bei 30 °C inkubiert. Nach 15 min. (A) und 4 h (B) wurde die Reaktion gestoppt und die Spaltprodukte im Reaktionsansatz nach Abzentrifugieren des Xylanrückstandes bestimmt. Es wurden 60 µl Probe aufgetragen. Abkürzungen: Xyl, Xylose; X2, Xylobiose; X2A, Arabinose-substituierte Xylobiose; X3, Xylotriose, 4-7, Polymerisationsgrad.

Xylotriose (X3) wird beim Haferspelzenxylan nicht gespalten. Es ist allerdings denkbar, daß der X3 - Peak Arabinose substituierte Xylobiose (X2A) enthält und diese nicht weiter hydrolysiert wird, da das Enzym keine Arabinose abspalten kann. Das Enzym scheint keine Xylobiose spalten zu können, da sich diese auch nach langer Inkubationszeit und zusätzlicher Enzymzugabe weiter anreichert. Im Dünnschichtchromatogramm (Abb. 29) konnte dieses Ergebnis ebenfalls gezeigt werden.

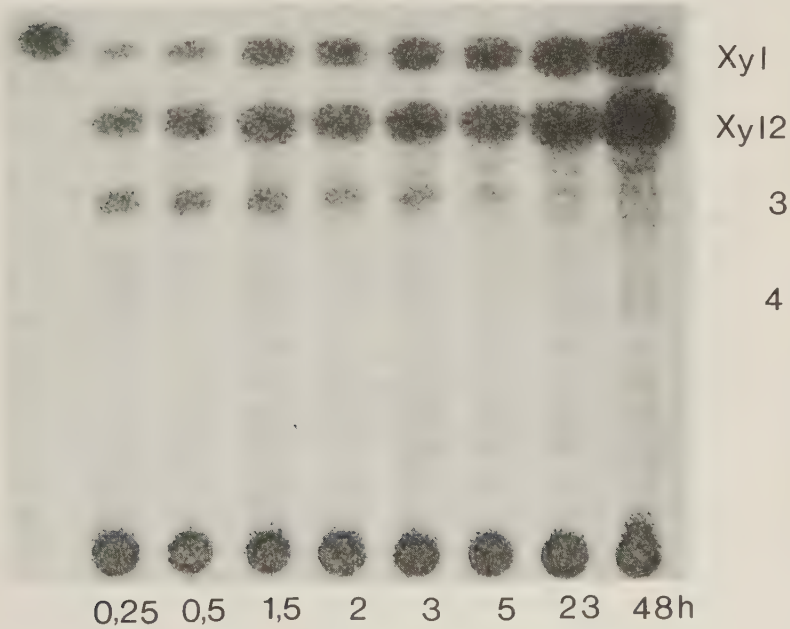


Abb. 29: Dünnschichtchromatogramm eines Xylanhydrolysates nach unterschiedlich langer Inkubation von Xylan mit gereinigter β-Xylanase.
Xyl: Xylose; X_2: Xylobiose; 3-4: Polymerisationsgrad

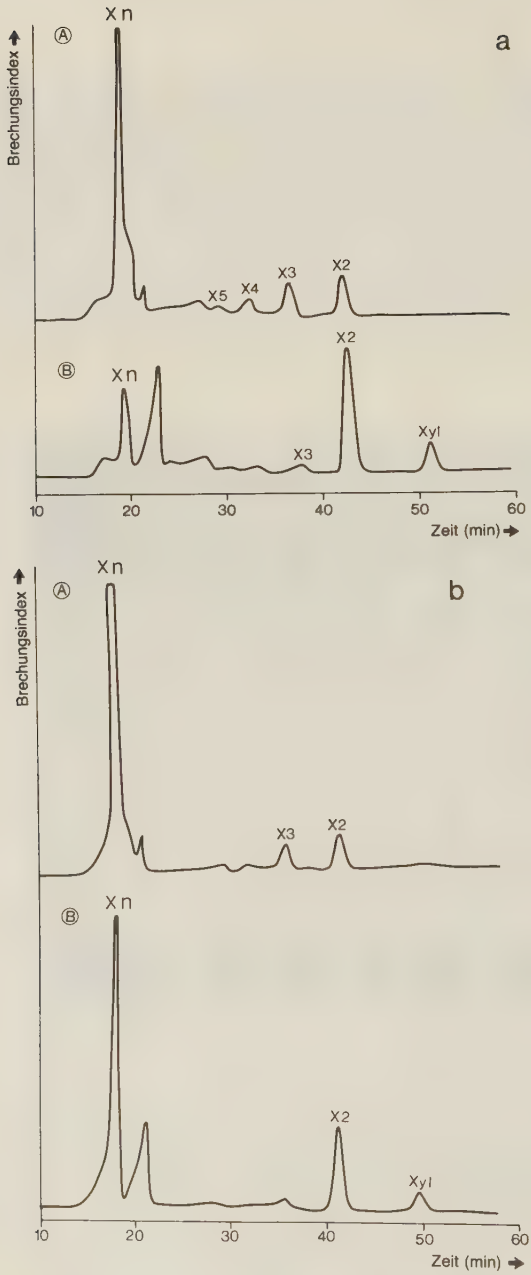


Abb. 30: Enzymatische Hydrolyse von Lärchenxylan (a) und Buchenxylan (b). X3-X4, Xylotetraose bzw. Xylopentaose. Bedingungen wie in Abb. 28.

Abbildung 30a,b zeigt die Hydrolyse von Lärchen- und Buchenxylan durch die β-Xylanase. Das Lärchenxylan enthielt nach totaler Säurehydrolyse nur Xylose, Arabinose war nicht vorhanden. Da es vermutlich eine schon weitgehend vorpräparierte Xylanfraktion (Abspaltung der Seitenketten) mit einer unverzweigten Kette aus Xylosemolekülen darstellt, erfolgte ein besserer und vollständigerer Abbau als beim Haferspelzenxylan oder Buchenxylan (Abb. 28, 30b). Die Hauptprodukte der Hydrolyse waren Xylobiose und Xylose. Xylotriose sowie Xylotetraose traten nur zu Beginn der Reaktion in relativ großen Mengen auf. Sie wurden nach längerer Inkubationszeit schnell zu Xylobiose und Xylose hydrolysiert. Größere Oligosaccharide als Xylotetraose konnten nicht nachgewiesen werden.

Aus Abbildung 30b geht hervor, daß die Hydrolyse des Buchenxylans im Vergleich zu Lärchenxylan oder Haferspelzenxylan relativ langsam erfolgt. Die Hydrolyseendprodukte waren Xylose und Xylobiose. Oligosaccharide mit höherem Polymerisationsgrad als Xylotriose konnten nicht nachgewiesen werden. Der Grund für den schlechteren Abbau des Buchenxylans ist vermutlich in dem höheren Gehalt an 4-O-Methyl-α-D-Glucuronosyl-Seitenketten zu suchen. Glucuronsäure-Substituenten wirken blockierend auf den Xylanabbau (Puls et al., 1978; Dekker und Richards, 1975). Bei dem in allen Chromatogrammen (Abb. 28, 30a,b) auftretenden, nicht identifizierten Peak handelt es sich wahrscheinlich um freigesetzte Farbstoffe aus dem Xylan.

Die Ergebnisse zeigen, daß die β-Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* Xylan nach dem typischen Muster eines Endoenzyms spaltet. Durch Behandlung mit Xylanase wird Xylan hauptsächlich zu Xylobiose und Xylose, sowie Xylotriose bei Anwesenheit von Arabinose (s. Diskussion), gespalten. Xylobiose wird nicht hydrolysiert.

Bei allen Xylanen blieb auch nach sehr langer Inkubationszeit ein nicht hydrolysierbarer Rest zurück. Vermutlich sind es phenolische Ligninanteile (Smith, 1981), Celluloseverunreinigungen und stark substituierte Xylooligosaccharide (hauptsächlich im Haferspelzen- und Buchenxylan), die nicht weiter gespalten werden können. Da bei der enzymatischen Hydrolyse keine Glukose freigesetzt wurde, kann man davon ausgehen, daß, wie schon in Versuchen zur Substratspezifität gezeigt, Cellulose von der Xylanase nicht hydrolysiert wird.

6. Untersuchungen zur β-Xylosidase-Aktivität

β-Xylosidasen sind Exo-Enzyme, die laut Literaturberichten aus β-1,4-Xylooligosacchariden Xylose vom nicht reduzierenden Ende abspalten (Puls et al., 1978; Takenishi et al., 1973). Xylan wird von β-Xylosidasen nur sehr schlecht oder gar nicht angegriffen (Deleyn et al., 1976; Fukumoto et al., 1970).
Während die Xylanasen meist von Organismen in die Kulturflüssigkeit abgeschieden werden (Puls et al., 1978; Sinner, 1975), sind die β-Xylosidasen häufig intrazellulär (Sörensen, 1957). So isolierten Claeyssens et al. (1976) eine β-Xylosidase sowohl aus den Zellen von *Bacillus pumilus* als auch aus *Penicillium wortmanni*. Bei der Hefe *Cryptococcus albidus* findet man das Enzym zwar extrazellulär, aber eng mit der Zellwand verbunden (Notario et al., 1976). Manchmal kann das Auftreten von Xylosidasen im Kulturfiltrat eine Frage der Kulturdauer sein. Bei *Aspergillus foetidus* (Whistler und Masak, 1955) oder auch bei einem *Aspergillus niger* Stamm (Reese et al. 1973) hat man beobachtet, daß das Enzym zunächst intrazellulär vorliegt, in älteren Kulturen aber infolge Autolyse der Zelle auch im Kulturfiltrat auftritt. Der thermophile Pilz *Malbranchea pulchella var. sulfurea* (Matsuo et al., 1977) sowie *Aspergillus niger* van Tiegham (Takenishi et al., 1973) scheiden das Enzym extrazellulär aus.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Aktivität der β-Xylosidase mit dem synthetischen Substrat p-Nitrophenyl-β-D-Xylopyranosid (PNXP) durchgeführt. Mit diesem Substrat war sowohl das Kulturfiltrat als auch die gereinigte Xylanase aktiv (Tab. 13). In den Reaktionsansätzen waren eigenartigerweise nicht nur PNXP und Xylose nachweisbar, sondern auch Xylobiose, die sich anhäufte (Abb. 31). Da eine Hydrolyse von Xylobiose auch bei Inkubation von Xylan mit Xylanase nicht beobachtet wurde (Abb. 28), handelt es sich bei der Umsetzung von PNXP durch Xylanase um Transferreaktionen.

	Protein (mg/ml)	spezifische Aktivität (U/mg)
Kulturfiltrat	0,121	0,132
gereinigte Xylanase	0,105	0,87
Zellextrakt	0,91	0,28

Tab. 13: Verteilung der β-Xylosidase-Aktivität in einer auf Xylan gewachsenen Kultur von *Trichosporon cutaneum*. Als Substrat für den Enzymtest diente PNXP. Die Inkubationstemperatur betrug 37 °C.

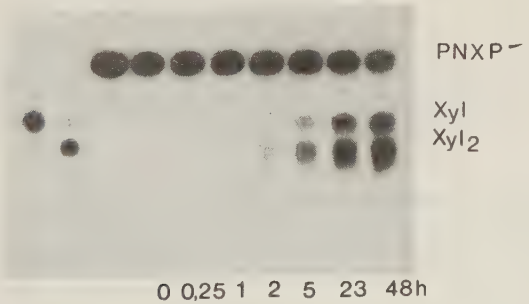


Abb. 31: Dünnschichtchromatographie der Abbauprodukte von PNXP durch die Xylanase von *Trichosporon cutaneum* nach unterschiedlich langer Inkubationszeit. Der Ansatz enthielt 1 ml PNXP-Lösung (20 mM in 0,1 M Mc Ilvainepuffer, pH 5), 0,1 ml Enzymlösung (10,5 µg Protein) und 0,4 ml Mc Ilvainepuffer. Inkubiert wurde bei 37 °C. Abkürzungen: Xyl, Xylose; Xyl_2, Xylobiose; PNXP, p-Nitrophenyl-β-D-Xylopyranosid.

Zellextrakt konnte ebenfalls PNXP spalten (Tab. 13). Das Aktivitätsoptimum lag jedoch bei pH 7, während das des Kulturfiltrates bzw. der gereinigten Xylanase bei pH 5 lag (Abb. 32). Diese deutlich ausgebildeten, unterschiedlichen pH-Optima weisen darauf hin, daß für die Xylosidase-Aktivität gegenüber PNXP im Kulturfiltrat sowie im Zellextrakt verschiedene Enzyme verantwortlich sind.

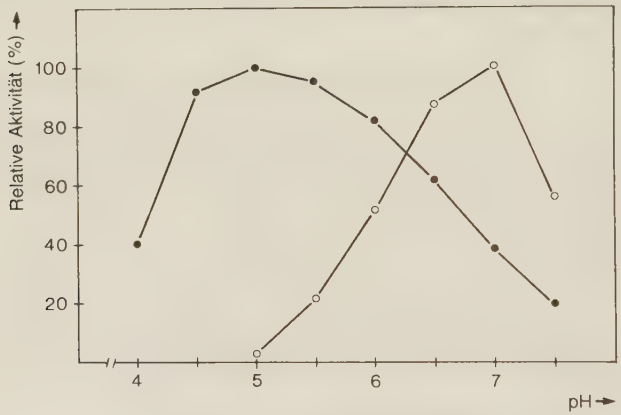


Abb. 32: Einfluß des pH auf die Reaktion der gereinigten Xylanase (●—●) und des Zellextraktes (o—o) aus *Trichosporon cutaneum* bei Inkubation mit p-Nitrophenyl-β-D-Xylopyranosid.

Einen Beweis dafür, daß im Zellextrakt Xylosidase-Aktivität vorhanden ist, lieferte das Abbaumuster des Xylans nach Inkubation mit Xylanase, sowie mit Xylanase, die mit Zellextrakt gemischt war. Wie aus Abb. 33 hervorgeht, wird das Xylan, wenn es nur mit Xylanase inkubiert wird, hauptsächlich zu Xylobiose, Xylotriose, Xylose und geringe Mengen Xylotetraose hydrolysiert. Wird der Xylanase allerdings Zellextrakt zugegeben, so ist eine Hydrolyse der Xylobiose zu beobachten. Bei Inkubation des Xylans mit Zellextrakt (ohne Xylanase) kommt ebenfalls Xylosidase-Aktivität zum Ausdruck

Abb. 33: Abbaumuster von Haferspelzenxylan nach Inkubation mit gereinigter Xylanase, Xylanase plus Zellextrakt und Zellextrakt ohne Xylanase. Die Ansätze enthielten 4,5 ml 2 %-ige Xylanlösung (in Aqua dest., pH 7), 1 ml Xylanaselösung (52,5 µg Protein) bzw. 1 ml Xylanaselösung (52,5 µg Protein) kombiniert mit Zellextrakt (455 µg Protein) bzw. 1 ml Zellextrakt (455 µg Protein). Inkubiert wurde bei 30 °C. Nach 2 h (A) und 7 h (B) wurden die Hydrolyseprodukte mittels HPLC bestimmt. Auftragmenge: 100 µl. Abkürzungen: Gluc, Glukose; Xyl, Xylose; X2 - X8, Xylooligosaccharide mit entsprechender Anzahl Xyloseeinheiten; Xn, Xylooligosaccharide mit unbekanntem Polymerisationsgrad.

(Abb. 33), da es zur Anhäufung von Xylose kommt. Diese Abspaltung einzelner Zucker von Xylooligomeren ist charakteristisch für Xylosidasen (Howard et al., 1960; Puls et al., 1978). Das Auftreten geringer Mengen an Xylooligosacchariden kann man erklären, wenn man annimmt, daß der X_n-Peak nicht nur aus langkettigen (150-200 Xyloseeinheiten) Xylooligomeren besteht, sondern auch Xylooligosaccharide mit kürzeren Xylanketten (10-15 Xyloseeinheiten) enthält. Da diese ebenfalls von der Xylosidase unter Abspaltung von Xylose hydrolysiert werden, kommen sie schließlich in einen Bereich (Xyloheptaose, Xylohexaose usw.), der von der HPLC-Säule aufgetrennt werden kann.

IV. DISKUSSION

Bei den bisher untersuchten Xylanasen aus Bakterien und Pilzen handelt es sich meist um Ektoenzyme, das sind Enzyme, die vom Organismus in das Kulturmedium abgeschieden werden (Horikshi und Atsukawa, 1973; Fogarty und Griffin 1972; Dekker und Richards, 1975, 1976). Man fand aber, daß die Xylanasen bei einigen Mikroorganismen auch eng mit der Zellwand verbunden sein können. Dies ist vor allem bei Darmbakterien der Fall. So ist die Xylanase des Darmbakteriums *Ruminococcus flavefaciens* (Pettipher und Latham, 1979a,b) größtenteils zellwandgebunden; ebenso die von Salyers et al. (1981) beschriebenen Xylanasen aus den Stämmen *Bacteroides ovatus* (VPI 0038) und *Bacteroides eggerthii* (VPI B8-51), sowie *Bacteroides amylogenes* und *Butyrivibrio* (Howard et al., 1960). Nach Untersuchungen von Notario et al. (1979) ist auch die Xylanase bei der Hefe *Cryptococcus albidus var. aerius* zellwandgebunden, während der von Biely et al. (1980a) beschriebene Hefestamm *Cryptococcus albidus* das Enzym extrazellulär in die Kulturflüssigkeit abscheidet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Hefe *Trichosporon cutaneum* auf Xylan als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann. Die dabei gebildete Xylanase wird in das Kulturmedium ausgeschieden. Die geringe intrazelluläre Aktivität ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß ein Teil der gebildeten Xylanase am Ende der Kulturdauer noch nicht ausgeschleust worden war.

Der anfangs schnelle Xylanabbau nahm mit fortschreitender Kulturdauer ab, obwohl die Xylanase-Aktivität gleich blieb. Dies kann mit der Abspaltung von Xyloseoligomeren und einem damit einhergehenden, zunehmenden Anteil von Verzweigungen (die Arabinose und Uronsäure enthalten) des Xylanrückstandes erklärt werden. So ist wiederholt beschrieben worden, daß Arabinose und Uronsäure als Seitenketten die Wirkung von Xy-

lanasen auf Xylan inhibieren (Dekker und Richards, 1975a; Comtat et al., 1974). Ebenso fand Puls et al. (1978), daß die β-1,4-Xylosidbindungen in der Nachbarschaft substituierter Xylosereste der enzymatischen Hydrolyse nicht zugänglich sind. Somit scheinen für eine katalytisch wirksame Anlagerung der Xylanase an das Substrat mindestens zwei unsubstituierte Xyloseeinheiten erforderlich zu sein (Goldschmidt und Perlin, 1963; Perlin und Reese, 1963; Sinner, 1975). Die gereinigte Xylanase aus *Trichosporon cutaneum*, wie auch das Kulturfiltrat waren nicht in der Lage, Arabinose abzuspalten. Demzufolge war zu erwarten, daß der Xylanrückstand nach Inkubation viele Arabinose-Substituenten enthält. Da, wie die Analyse ergab, dies nicht der Fall war, muß man annehmen, daß Arabinose, gebunden an ein Hydrolyseprodukt (z.B. Xylotriose + Arabinose = X3A), von der Zelle aufgenommen wird. Die Hydrolyse des Xylanrückstandes scheint somit vielmehr durch die 4-O-Methyl-Glucuronsäure inhibiert zu werden.

Nach Angaben in der Literatur können Xylanasen sowohl induktiv als auch konstitutiv synthetisiert werden. So zeigten einige Autoren (Lyr und Novak, 1961; Varadi et al., 1971; Gosh et al., 1980), daß die Xylanasen vieler holzzerstörender Pilze konstitutiv, also unabhängig von der Kohlenstoffquelle (z.B. auf Pektin, Stärke, Mannan) gebildet werden. Bei anderen Organismen wiederum wird die induktive Bildung des Enzyms beschrieben (Nakanishi et al., 1976; Gascoigne und Gascoigne, 1960; Hashimoto et al., 1971; Dekker und Richards, 1975). Arbeiten von Björndal (zitiert in Eriksson und Rzedowski, 1969) charakterisieren die Xylanase aus *Stereum sanguinolentum* als ein selbstinduziertes Enzym. Im Mycel dieses Pilzes konnte Xylan nachgewiesen werden, so daß der zuerst angenommene konstitutive Charakter des Enzyms auf ein allgemeines Vorkommen von Xylan in der Zellwand von Pilzen zurückgeführt werden kann (Sinner, 1974, 1975); die Xylanase wird zur Lysis alten Zellmaterials induziert. Im Falle von *Trichosporon cutaneum* erwiesen

sich nur Xylan und Xylose als Induktoren. Trotz guten Wachstums auf Glukose und Cellobiose erfolgte keine Xylanaseproduktion.

Die extrazelluläre Produktion der Xylanase durch *Trichosporon cutaneum*, sowie die Tatsache, daß keine cellulolytischen Enzyme synthetisiert werden, erleichtern die Isolierung und Charakterisierung dieser Xylanase. Der Organismus scheidet relativ wenig andere Proteine ins Nährmedium aus, wie aus der geringen Anreicherung von 3,7-fach hervorgeht. Daher ist der Aufwand für die Enzymreinigung gering. Biely et al. (1980a, 1980b) isolierten bereits eine Xylanase aus dem Kulturfiltrat der Hefe *Cryptococcus albidus*. Sie benötigten dafür 3 Reinigungsschritte, erhielten jedoch nur eine Ausbeute von 6,5 %. Ähnlich wie bei der Reinigung der Xylanase von *Cryptococcus albidus*, so traten auch im Falle der Isolierung des Enzyms von *Trichosporon cutaneum* Schwierigkeiten auf. Das Kulturfiltrat wurde nämlich beim Konzentrieren ziemlich viskos, was eine chromatographische Auftrennung der Proteine erschwerte. In diesem Fall erwies sich eine Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose für den ersten Anreicherungsschritt als die geeignete Methode, mit einer daran anschließenden Gelfiltration. So gelang es in nur zwei Schritten das Enzym mit einer Ausbeute von 61 % (bezogen auf die Gesamtaktivität) zu isolieren.

Mit diesem isolierten Enzym wurde mit zwei verschiedenen Methoden (Gelfiltration und SDS-Gelelektrophorese) ein Molekulargewicht von 45000 bzw. 44500 ermittelt. Somit unterscheidet sich die gereinigte Xylanase deutlich von der Xylanase aus *Cryptococcus albidus*, die ein Molekulargewicht von 28000 hat (Biely et al., 1980a), sowie dem der meisten bisher untersuchten anderen Xylanasen. Von nur wenigen Xylanasen ist ein Molekulargewicht von über 45000 bekannt (Gosh et al., 1980; John et al., 1979). Eine Besonderheit ist die Xylanasefraktion V aus *Fusarium avenaceum* mit einem Molekulargewicht von 250000 (Sobezak und Urbanek, 1981). Allerdings zerfällt diese nach

Behandlung mit Harnsäure in Fraktionen von 130000 und 60000.

Ein Vergleich der Aktivitäten verschiedener Xylanasen ist problematisch (Lyr und Novak, 1961), da einmal unterschiedliche Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivitäten benutzt wurden. So messen Gorbacheva und Rodionova (1977) die Endoxylanase-Aktivität durch viskosimetrische Bestimmungen, während die meisten Autoren die aus dem Xylan freigesetzten reduzierenden Zucker bestimmen. Zum anderen erschwert die Verwendung verschiedener Substrate (Xylane unterschiedlicher Herkunft) ebenfalls einen Vergleich der Aktivitäten. Die Xylane unterscheiden sich in Art und Anzahl ihrer Substituenten, was zu unterschiedlichen Hydrolysegeschwindigkeiten führt. Ferner lassen unterschiedliche Testbedingungen wie Temperatur und Inkubationszeit, einen Aktivitätsvergleich kaum zu (s. Tab. 14). Bei nur kurzen Inkubationszeiten erhält man höhere Enzymaktivitäten als bei längeren Inkubationszeiten, da im Verlaufe der Reaktion die Kettenlänge des Xylans abnimmt und somit die Hydrolysegeschwindigkeit verringert wird (Sinner, 1975; Howard et al. 1960). Versuche zur Bestimmung der Michaelis-Menten Konstanten für Polysaccharidhydrolysierende Enzyme sind mit einigen Problemen behaftet. Voraussetzung für eine genaue Ermittlung des K_M-Wertes ist ein einheitliches Substrat in bekannten Konzentrationen. Polysaccharide sind aber in der Regel recht heterogen bezüglich ihres Molekulargewichtes. Ferner können die Produkte aus Enzymreaktionen wieder als Substrate fungieren. Somit ändern sich während der Inkubation die eigentlichen Substrate sowie deren Konzentrationen. Aus diesem Grund, und den unterschiedlichen Testbedingungen sind vergleichende Aussagen über die Affinität von Xylanasen zum Xylan und über die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} nur begrenzt möglich. Tabelle 14 zeigt aber, daß die K_M-Werte verschiedener mikrobieller Xylanasen, mit Ausnahme von *Ceratocystis paradoxa II* und *Schizophyllum commune*, die gleiche Größenordnung haben.

Stamm	Substrat	K_M (mg/ml)	v_{max} $\left[\frac{\mu Mol}{min \times mg}\right]$	Temperatur (°C)	Inkubationszeit (min)	Quelle
Ceratocystis paradoxa I	Xylan aus der Quecke	4,24	72,9	37	30	Dekker und Richards, 1975a
Ceratocystis paradoxa II	Xylan aus der Quecke	0,27	32,3	45	30	Dekker und Richards, 1975b
Aspergillus niger	Carboxymethylxylan aus Weizenstroh	3	nicht bestimmt	40	10	Gorbacheva und Rodionova, 1977b
Asp. niger van Tieghem I	Arabinoxylan aus Reisstroh	7	30,7	40	60	Takenishi und Tsujisaka, 1975
Asp. niger van Tieghem II	Arabinoxylan aus Reisstroh	9	12,9	40	60	Takenishi und Tsujisaka, 1975
Asp. niger van Tieghem III	Arabinoxylan aus Reisstroh	6	15,6	40	60	Takenishi und Tsujisaka, 1975
Schizophyllum commune	Lärchenxylan (Sigma)	8,37	0,443	30	10	Paice et al., 1978
Schizophyllum commune	Buchenxylan	14	nicht bestimmt	40	5	Varadi et al., 1971
Termitomyces clypeatus	Lärchenxylan (Sigma)	4	74,1	40	30	Gosh et al., 1980
Trichosporon cutaneum	Haferspelzenxylan	1,5	43,5	30	10	

Tab. 14: Vergleich von K_M und v_{max}-Werten von Xylanasen verschiedener Mikroorganismen.

Wie die Versuche zeigten, spaltet die Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* Xylan nach dem Muster eines typischen Endoenzyms. Dabei entsteht als Hauptendprodukt Xylobiose, die von der Xylanase nicht weiter gespalten werden kann. Bei der Hydrolyse von Arabinose-haltigem Haferspelzenxylan entstehen neben Xylobiose und Xylose Abbauprodukte mit einem Polymerisationsgrad von 3 bzw. 4 (Abb. 28), die nicht weiter hydrolysiert werden. Da Arabinose währen der gesamten Inkubationszeit nicht freigesetzt wird, muß man davon ausgehen, daß sie die weitere Hydrolyse dieser Bruchstücke blockiert. Somit ist denkbar, daß der im Chromatogramm mit X3 bzw. X2A bezeichnete Peak (Abb. 28) Arabinose-substituierte Xylobiose enthält. Die Hydrolyse des mit einem Polymerisationsgrad von 4 bezeichneten Abbauproduktes könnte ebenfalls durch Arabinosesubstituenten verhindert werden. Diese Annahme wird bestätigt durch Untersuchungen des enzymatischen Abbaus von Xylanen, die keine Arabinose enthalten (Abb. 30). Beim Lärchenxylan (vorpräpariertes Xylan ohne Seitenketten), sowie beim Buchenxylan, das als Laubholzxylan keine Arabinosesubstituenten besitzt, wird die nach kurzer Inkubationszeit freigesetzte Xylotriose weiter hydrolysiert zu Xylobiose und Xylose. Xylobiose wird nicht weiter gespalten.

Beim Haferspelzen- und Buchenxylan blieb selbst nach langer Inkubationszeit (3 Tage) ein nicht oder nur noch sehr langsam hydrolysierbarer Xylanrest zurück. Dies ist mit einer Inaktivierung des Enzyms nicht zu erklären, da selbst nach 7 Tagen Inkubation bei 30 ^{o}C noch etwa 50 % der Enzym-Aktivität vorhanden waren und auch nach erneuter Enzymzugabe kein weiterer Xylanabbau erfolgte. Vermutlich erschwert die abnehmende Kettenlänge und die damit zunehmende Verzweigung des Xylans die Hydrolyse (Sinner, 1975). Der vollständigere Abbau des Lärchenxylans im Vergleich zu den anderen Xylanen ist auf das Fehlen von Substituenten zurückzuführen, die durch sterische Effekte die Xylanhydrolyse inhibierend beeinflussen (Comtat et al., 1974).

Die Xylanasen einiger Pilze enthalten Kohlenhydrate (Toda et al., 1971; Gorbacheva und Rodionova, 1977a; Sobczak und Urbanek, 1981). Für Glykoproteine ist charakteristisch, daß der Kohlenhydratanteil kovalent an das Protein gebunden sein muß (Schmid, 1964; Paice et al., 1970; Spiro, 1970, 1972). Unter den Xylanasen sind bisher nur im Falle der Xylanase aus *Schizophyllum commune* (Paice et al., 1978) eingehendere Untersuchungen über eine solche Zuckerbindung durchgeführt worden. Bei diesem Enzym dissoziierten die Zucker nach SDS-Behandlung ab. Demzufolge waren sie nicht kovalent an das Protein gebunden. Aufgrund seiner Untersuchungen kommt Paice zu der Annahme, daß es sich bei diesem Enzym nicht um ein Glykoprotein handelt.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die gereinigte Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* Zucker enthält. Der Anteil schwankte allerdings von Präparation zu Präparation, wie es auch bei Xylanase aus *Schizophyllum commune* beobachtet wurde. Trotz des unterschiedlichen Zuckeranteils wurden jedoch identische Werte für das Enzym von *Trichosporon cutaneum* hinsichtlich Temperaturstabilität, pH-Stabilität, pH-Optimum und auch Enzymaktivität gefunden. Somit ist anzunehmen, daß der unterschiedliche Kohlenhydratanteil die Aktivität der Xylanase nicht beeinflußt. Da ferner die Zukker durch SDS-Behandlung abdissoziieren, handelt es sich möglicherweise um eine unspezifische Adsorption der Zucker. Diese Tatsache, sowie das Auftreten von Rhamnose - einem für Glykoproteine nicht typischen Zucker - im Zuckeranteil des Proteins sprechen daher gegen den Glykoprotein-Charakter dieses Enzyms. Galaktose und Rhamnose wurden in einer relativ hohen Konzentration im Kohlenhydratanteil des Proteins nachgewiesen, obwohl mit den angewandten Methoden im Nährmedium keine Rhamnose und Galaktose lediglich in Spuren (Abb. 7) gefunden wurde. Diese selektive Anreicherung der beiden Zucker im Zucker-Protein-Komplex könnte somit auf Stoffwechselprozesse der Zelle zurückzuführen sein. Aus der Literatur ist

bekannt, daß Proteine ohne kovalent gebundenen Zuckeranteil zum besseren Transport durch die Zellmembran von einer Kohlenhydrat-haltigen Membran umgeben werden können (Eylar et al., 1965). Darüber hinaus könnten auch die nicht kovalent gebundenen Kohlenhydrate für das Protein als Proteaseschutz oder zur Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Struktur von Bedeutung sein, wie es für echte Glykoproteine beschrieben wurde (Gottschalk und Fazekas de St. Groth, 1960; Pazur et al., 1970).

Die in den Versuchen mit p-Nitrophenyl-β-D-Xylopyranosid gemessene Aktivität ist, wie schon von Biely et al. (1980a) bei der Xylanase aus der Hefe *Cryptococcus albidus* gefunden wurde, auf eine Affinität der Xylanase zum PNXP zurückzuführen. Biely et al.(1980c) beschreiben die Freisetzung von p-Nitrophenol aus PNXP bei der Reaktion mit Xylanase nicht als eine einfache Hydrolyse des Substrates zu Xylose und p-Nitrophenol, sondern als Ergebnis von Glycosyl-Transferreaktionen mit Bildung von größeren Zwischenprodukten (Phenyloligosacchariden) und ihrer anschließenden Hydrolyse. Diese Reaktionen sind von den Autoren in einem Schema zusammengefaßt worden, das in Abb. 34 wiedergegeben ist. Sie konnten im Dünnschichtchromatogramm Xylobiose, Xylose, sowie nach kurzen Inkubationszeiten geringe Mengen an Xylotriose und Xylotetraose nachweisen. Das Hauptprodukt der Reaktion war Xylobiose. Bei diesen Transferreaktionen wird p-Nitrophenol freigesetzt.
In den Versuchen mit der Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* waren lediglich Xylose und Xylobiose nachweisbar. Höhere Xylooligomere wurden nicht gefunden, da sie wahrscheinlich sehr schnell durch das Enzym zu Xylobiose und Xylose hydrolysiert wurden. Xylobiose war das Hauptprodukt der Reaktion. Dies zeigt, daß echte Xylosidase-Aktivität nicht vorhanden war. Somit ist anzunehmen, daß das Auftreten von Xylose und Xylobiose auch auf Glycosyl-Transferreaktionen zurückzuführen ist.

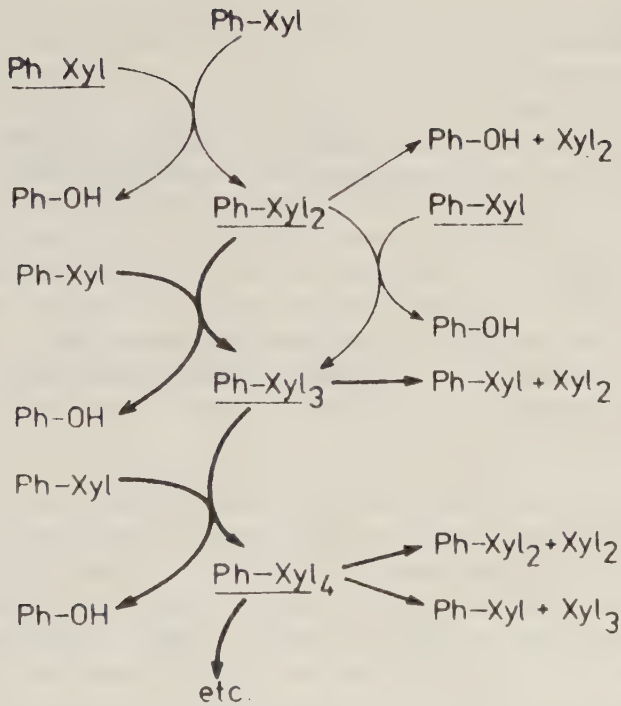


Abb. 34: Reaktionsschema für den postulierten Abbau von PNXP durch die β-Xylanase (aus Biely et al., 1980c). Extrem langsame Reaktionen sind durch dünne Pfeile markiert. Abkürzungen: Xyl, Xylose; Xyl_2, Xylobiose; Xyl_3, Xylotriose; Xyl_4, Xylotetraose;PhOH, p-Nitrophenol; Ph-Xyl, Phenyl-β-Xylosid; Ph-Xyl_2, Ph-Xyl_3, usw., Phenylglycoside von β-1,4-Xylooligosacchariden.

Die Untersuchungen zum enzymatischen Xylanabbau durch *Trichosporon cutaneum* haben gezeigt, daß diese Hefe durch Bildung extrazellulärer Xylanasen fähig ist, Xylane zu hydrolysieren. Damit ergeben sich Möglichkeiten, den Organismus zur mikrobiellen Verwertung pflanzlicher Rückstände einzusetzen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Untersuchungen zum Xylanabbau durch die Hefe *Trichosporon cutaneum* ergaben, daß dieser Organismus auf Xylan als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle sehr gut wachsen kann. Innerhalb von 2 - 3 Tagen werden bis zu 70 % des Xylans abgebaut. Das zur Hydrolyse des Xylans notwendige Enzym, die 1,4-β-D-Xylan Xylanohydrolase EC 3.2.1.8, wird beim Wachstum auf Xylan ins Nährmedium ausgeschieden. Versuche zur Regulation ergaben, daß dieses Enzym nicht nur beim Wachstum auf Xylan, sondern auch auf Xylose gebildet wird.

2. Die Xylanase wurde über DEAE-Cellulose-Chromatographie und Gelfiltration aus dem Kulturfiltrat von *Trichosporon cutaneum* gereinigt. Das Molekulargewicht des Enzyms wurde mittels Gelchromatographie zu 45000 bestimmt. Da bei der SDS-Gelelektrophorese der gleiche Wert erhalten wurde, besteht das Enzym vermutlich nur aus einer Polypeptidkette.

3. Das Enzym zeigt gegenüber Xylan optimale Aktivität bei pH 5 und einer Temperatur von 50 ^{o}C. Sufhydrylreste sowie Metallionen sind für die Aktivität nicht essentiell.

4. Die Xylanase aus *Trichosporon cutaneum* hydrolysiert das Xylan, wie die meisten der bisher untersuchten Xylanasen, nach dem Endomechanismus. Die Xylankette wird dabei in der Mitte gespalten, und es entstehen zunächst niedermolekulare Oligosaccharide, welche dann weiter zu Xylobiose und Xylose hydrolysiert werden. Obwohl das Enzym p-Nitrophenyl-ß-D--Xylopyranosid in begrenztem Maße umsetzen kann, wird Xylobiose von der Xylanase nicht weiter hydrolysiert. Es konnte intrazellulär eine Xylosidase nachgewiesen werden.

5. Untersuchungen bezüglich des Glykoproteincharakters ergaben, daß trotz des Nachweises von Kohlenhydraten nach Säurehydrolyse des Enzyms, diese Xylanase vermutlich kein Glykoprotein ist. Die Zucker waren nämlich nicht, wie dies für Glykoproteine typisch ist, kovalent an das Protein gebunden, da sie nach SDS-Behandlung abgetrennt werden konnten.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Andrews, P. (1964): Estimation ot the Molecular Weights of Proteins by Sephadex Gel-Filtration. Biochem. J. 91, 222-233

Aspinall, G.O. und McKay, J.E. (1958): The Hemicellulose of European Larch (Larix decidua). Part I. The Constituion of a Xylan. J. Chem. Soc. 1059-1066

Aspinall, G.O. (1959): Structural Chemistry of the Hemicelluloses. Adv. Carbohydr. Chem. 14, 429-468

Aspinall, G.O. (1980): Carbohydrates: Structure and Function. In: The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise, 3, 490-500. Hrg.: Preiss, J., Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco

Biely, P., Vrsanska, M., Kratky, Z. (1980a): Xylan-Degrading Enzymes of the Yeast *Cryptococcus albidus*. Identification and Cellular Localization. Eur. J. Biochem. 108, 313-321

Biely, P., Kratky, Z., Vrsanska, M., Urmanicova, D. (1980b): Induction and Inducers of Endo-1,4-β-xylanase in the yeast *Cryptococcus albidus*. Eur. J. Biochem. 108, 323-329

Biely, P., Vrsanska, M., Kratky, Z. (1980c): Complex Reaction Pathway of Aryl β-Xyloside Degradation by β-Xylanase of *Cryptococcus albidus*. Eur. J. Biochem. 112, 375-381

Bisaria, V.S. und Ghose, T.K. (1981): Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. Enzyme Microbiol. Technol. 3, 90-104

Bonse, D. (1974): Polysaccharidabbau durch Hefen. Dissertation, Institut für Gärungstechnologie Berlin, Biologisches Laboratorium

Boyer, P.D. (1954): Spectrophotometric Study of the Reaction of Protein Sulfhydryl Groups with Organic Mercurials. J. Am. Chem. Soc. 76, 4331-4337

Bradford, M.M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72, 248-254

Bringer, S. (1980): Untersuchungen zum C_1-Stoffwechsel des Braunfäulepilzes *Poria contigua* und Charakterisierung der Alkoholoxidase. Dissertation, Kernforschungsanlage Jülich

Buchholz, K., Puls, J., Gödelmann, B., Dietrichs, H.H. (1980/81): Hydrolysis of Cellulosic Wastes. Process Biochemistry 16, 37-43

Burgess, R.R. (1969): Separation and Characterization of the Subunits of Ribonucleic Acid Polymerase. J. Bio. Chem. 244, 6168-6176

Claeyssens, M., Doorslaer, E., Deleyn, F., Kersters-Hilderson, H. (1976): Comparative Study of β-D-Xylosidase Induced in Fungal and Bacterial Strains. VIII. International Symposium on Carbohydrate Chemistry, August 16-20.

Clarke, R.T.J., Bailey, R.W., Gaillard, B.D.E. (1969): Growth of Rumen Bacteria on Plant Cell Wall Polysaccharides J. gen Microbiol. 56, 79-86

Comtat, J.C., Joseleau, J.P., Bosso, C., Barnoud, F. (1974): Characterization of Structurally Similar Neutral and Acidic Tetrasaccharides obtained from the Enzymic Hydrolyzate of a 4-O-Methyl-D-Glucurono-D-Xylan. Carbohydrate Research 38, 217-224

Cooney, C.L., Wang, D.I.C., Wang, S.D., Gordon, J., Jiminez, M. (1978): Simultaneous Cellulose Hydrolysis and Ethanol Production by a Cellulolytic Anaerobic Bacterium. Biotechnol. Bioeng. 8,103-114

Dekker, R.F.H. und Richards, G.N. (1975a): Purification, Properties and Mode of Action of Hemicellulase I Produced by *Ceratocystis paradoxa*. Carbohydrate Research 39, 97-114

Dekker, R.F.H. und Richards, G.N. (1975b): Purification, Properties and Mode of Action of Hemicellulase II Produced by *Ceratocystis paradoxa*. Carbohydrate Research 42, 107-123

Dekker, R.F.H. und Richards, G.N. (1976): Hemicellulases: Their Occurence, Purification, Properties and Mode of Action. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 32, 277-352

Deleyn, F., Claeyssens, M., Kerstens-Hilderson, H., De Bruyne, C.K. (1976): Purification of β-xylosidase induced in *Penicillium wortmanni*. Arch. Int. Physiol. Biochem. 84, 156-157

Eriksson, K.E. und Rzedowski, W. (1969): Extracellular Enzyme System Utilized by the Fungus *Chrysosporium lignorum* for the Breakdown of Cellulose. I. Studies on the Enzyme Production. Arch. Biochem. Biophy. 129, 683-688

Eriksson, K.E. und Pettersson, B. (1971): Purification and Characterization of Xylanase from the Rot Fungus *Stereum sanguinolentum*. Int. Biodetn. Bull. 7, 115-119

Eylar, E.H. (1965): On the Biological Role of Glycoproteins. J. Theoret. Biol. 10, 89-113

Fairbanks, G., Steck, L., Wallach, D.F.H. (1971): Electrophoretic Analysis of the Major Polypeptides of the Human Erythrocyte Membrane. Biochemistry 10, 2606-2617

Fogarty, W.M. und Griffin, P.J. (1972): Preliminary Investigations on the Production, Purification and Properties of an Extracellular Xylanase form *Bacillus polymyxa*. Biochem. J. 128, 125-126

Fukui, S. und Sato, M. (1957): On the Xylanase System of *Aspergillus batatae*. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 21, 392-393

Fukui, S. (1958): Degradation of Xylan by the Xylanase System of *Aspergillus oryzae No. 8*. J. Gen. Appl. Microbiol. 4, 39-50

Fukumoto, J., Tsujisaka, Y., Takenishi, S. (1970): Studies on the Hemicellulases. Part I. Purification and Some Properties of Hemicellulases from *Aspergillus niger* von Tieghem sp. Nippon Nogei Kagaku Kaishi. 44, 447-456

Gascoigne, J.A. und Gascoigne, M.M. (1960): The Xylanases of *Fusarium roseum*. J. gen. Microbiol. 22, 242-248

Ghosh, B.S. und Kundu, A.B. (1980): Induction of Cellulases and Hemicellulases by Tamarind (Tamarindus indica) Kernel Polysaccharide, J. Ferment. Technol. 58, 135-141

Goldschmid, H.R. und Perlin, A.S. (1963): Interbranch Sequences in the Wheat Arabino-Xylan. Selective Enzymolysis Studies. Can. J. Chem. 41, 2272-2277

Gorbacheva, I.V. und Rodionova, N.A. (1977a): Studies on Xylan Degrading Enzymes. I. Purification and Characterization of Endo-1,4-β-Xylanase from *Aspergillus niger Str. 14*. Biochim. Biophys. Acta 484, 79-93

Gorbacheva, I.V. und Rodionova, N.A. (1977b): Studies on Xylan-Degrading Enzymes. II. Action Pattern of Endo-1,4-β-Xylanase from *Asperillus niger Str. 14* on Xylan and Xylooligosaccharides. Biochim. Biophys. Acta 484, 94-102

Gottschalk, A. und Fazekas de St. Groth, S. (1960): Studies on Mucoproteins. III. The Accessibility to Trypsin of the Susceptible Bonds in Ovine Submaxillary Gland Mucoprotein. Biochim. Biophys. Acta 43, 513-519

Gremli, H. (1968): Untersuchungen mit einer α-L-Arabinofuranosidase von *Aspergillus niger*. Dissertation Nr. 4140, Eidgen. Techn. Hochschule Zürich.

Hashimoto, S., Muramatsu, T., Funatsu, M. (1971): Studies on Xylanase from *Trichoderma viride*. Part I. Isolation and some Properties of Crystalline Xylanase. Agr. Biol. Chem. 35, 501-508

Herbert, D., Phipps, P.J., Strange, R.E. (1971): Chemical Analysis of Microbial Cells. IV. Determination of Protein. In: Methods in Microbiology 5 b, 242-252. Hrg.: Norris, J.R. und Ribbons, D.W., Academic Press, London, New York

Horikoshi, K. und Atsukawa, Y. (1973): Xylanase Produced by Alkalophilic *Bacillus No. C-59-2*. Agr. Biol. Chem. 37, 2097-2103

Howard, B.H., Jones, G., Purdom, M.R. (1960): The Pentosanases of some Rumen Bacteria. Biochem. J. 74, 173-180

Hrazdina, G. und Neukom, H. (1966): Isolation of a xylanase from a commercial cellulase. Biochem. Biophys. Acta 128, 402-403

Iizuka, H. und Kawaminami, T. (1965): Studies on the Xylanase from *Streptomyces*. Part I. Purification and some Properties of Xylanase from *Streptomyces xylophagus nov. sp.* Agr. Biol. Chem. 29,520-524

Inaoka, M. und Soda, H. (1956): Crystalline Xylanase. Nature (London) 178, 202-203

Inoue, M., Okada, S., Fukumoto, J. (1970a): Studies on Juice-clarifying enzymes: II. Purification of Accelerating Factor for Juice Clarification and Some Properties of the Purified Preparation. Nippon Nogei Kogaku Kaishi. 44, 1-7

Inoue, M., Okada, S., Fukumoto, J. (1970b): Studies on Juice-clarifying enzymes: III. Accelerating Effect of the Hemicellulase III on the Clarification of Suspension of Insoluble Particles from Orange Juice. Nippon Nogei Kogaku Kaisi. 44, 8-14

Iwamoto, T., Sasaki, T., Inaoka, M. (1973): Purification and Some Properties of Xylanase from *Aspergillus niger*. Mem. Ehime Uni. 17, 185-197

John, M., Schmidt, B., Schmidt, J. (1979): Purification and some properties of five endo-1,4-β-D-xylanases and a β-D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*. Chan. J. Biochem. 57, 125-134

Kanaya, K., Chiba, S., Shimomura, T. (1978): Thin-layer Chromatography of Linear Oligosaccharides. Agr. Biol. Chem. 42, 1947-1948

Kesler, R.B. (1967): Rapid Quantitative Anion-Exchange Chromatography of Carbohydrates. Anal. Chem. 39, 1416-1422

Kratky, Z. und Biely, P. (1980): Inducible β-Xyloside Permease as a Constituent of the Xylan-Degrading Enzyme System of the Yeast *Cryptococcus albidus*. Eur. J. Biochem. 112, 367-373

Lineweaver, H. und Burk, D. (1934): The Determination of Enzyme Dissociation Constants. J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666

Lynch, J.M., Slater, J.H., Bennett, J.A. (1980): The Characterisation of Mixed Populations Degrading Cellulose in Straw. In: Colloque Cellulolyse Microbienne, Centre National De La Recherche Scientifique, 187-190

Lyr, H. und Novak, E. (1961): Vergleichende Untersuchungen über die Bildung von Cellulasen und Hemicellulasen bei einigen Pilzen. Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie 2, 86-98

Matsuo, M., Yasui, T., Kobayashi, T. (1977): Purification and Some Properties of β-Xylosidase from *Malbranchea pulcella var. sulfurea No. 48*. Agric. Biol. Chem. 41, 1593-1599

Maurer, H.R. (1971): Disc Electrophoresis and Related Techniques of Poylacrylamide Gel Electrophoresis. Walter de Gruyter, Berlin, New York

Montedoro, G. und Bertuccioli, M. (1976): Trials on the use of different enzyme preparations in red wine making. Lebensm.Wiss. u. Technol. 9,225-231

Moraw, E. (1979/80): Untersuchungen zum Kohlenhydratabbau durch *Doratomyces microsporus*. Diplomarbeit, Kernforschungsanlage Jülich

Nakane, A. (1978): Proteases Produced by a Proteolytic Mutant of *Clostridium botulinum* Type E. J. Gen. Microbiol. 107, 85-91

Nakanishi, K., Yasui, T., Kobayashi, T. (1976): Inducers for the Xylanase Production by *Streptomyces sp.* J. Ferment. Technol. 54, 801-807

Nakanishi, K. und Yasui, T. (1980): Kinetic Studies on Xylanase Induction by β-Xyloside in *Streptomyces sp.* Agric. Biol. Chem. 44, 1885-1889

Nelson, N. (1944): A Photometric Adaptation of the Somogyi Methode for the Determination of Glucose. J. Biol. Chem. 153, 375-380

Neville, D.M. (1971): Molecular Weight Determination of Protein-Dodecyl Sulfate Complexes by Gel Electrophoresis in a Dicontinuous Buffer System. J. Biol. Chem. 246, 6328-6334

Notario, V., Villa, T.G., Villanueva, J.R. (1976): β-Xylosidases in the Yeast *Cryptococcus albidus var. aerius.* Can. J. Microbiol. 22, 312-315

Notario, V., Villa, T.G., Villanueva, J.R. (1979): Cell Wall-associated 1,4-β-D-Xylanase in *Cryptococcus albidus var. aerius:* in situ Characterization of the Activity. J. Gen. Microbiol. 114, 415-422

Paice, M.G., Jurasek, L., Carpenter, M.R., Smillie, L.B. (1978): Production, Characterization and Partial Amino Acid Sequence of Xylanase A form *Schizophyllum commune.* Appl. Envir. Microbiol. 36, 802-808

Pazur, J.H., Knull, H.R., Simpson, D.L. (1970): Glycoenzymes: A Note on the Role for the Carbohydrate Moieties. Biochem. Biophys. Res. Comm. 40, 110-116

Perlin, A.S. und Reese, E.T. (1963): Dimensions of the Substrate Site Involved in the Enzymolysis of a Polysaccharide. Can. J. Biochem. Physiol. 41, 1842-1846

Pettipher, G.L. und Latham, M.J. (1979a): Characteristics of Enzymes Produced by *Ruminococcus flavefaciens* which Degrade Plant Cell Walls. J. Gen. Microbiol. 110, 21-27

Pettipher, G.L. und Latham, M.J. (1979b): Production of Enzymes Degrading Plant Cell Walls and Fermentation of Cellobiose by *Ruminococcus flavefaciens* in Batch and Continuous Culture. J. Gen. Microbiol. 110, 29-38

Prestige, L., Gage, V., Spizizen, J. (1971): Protease Activities During the Course of Sporulation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 107, 815-823

Puls, J., Sinner, M., Dietrichs, H.H. (1978): Trägergebundene xylanolytische Enzyme. I. Wirkungsweise xylanolytischer Enzyme. Starch-Stärke 30, 294-299

Reese, E.T., Maguire, A., Parrish, F.W. (1973): Production of β-D-xylopyranosidases by fungi. Can. J. Microbiol. 19, 1065-1074

Reese, E.T., Mandels, M., Weiss, A.H. (1972): Cellulose as a Novel Energy Source. In: Advances in Biochemical Engineering. 181-200. Hrg.: Ghose, T.K., Fiechter, A., Blakebrough, N. 2. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Reddy, M.N., Stuteville, D.L., Sorensen, E.L. (1974): Xylanase Activity of *Xanthosmonas alfalfae* in Culture and during Pathogenesis of Bacterial Leaf Spot of Alfalfa. Phytopath. Z. 80, 215-223

Rickard, P.A.D. und Laughlin, T.A. (1980): Detection and Assay of Xylanolytic Enzymes in a *Cellulomonas* Isolate. Biotechnol. Lett. 2, 363-368

Sahm, H. (1978): Mikrobielle Umsetzung pflanzlicher Rückstände in org. Rohstoffe. Biotechnologie, Hrg.: Bundesministerium für Forschung und Technologie, Umschau Verlag, Frankfurt a. Main

Sahm, H. (1979): Pflanzliche Rückstände als Substrate in der Biotechnologie. Forum Mikrobiologie 4, 177-182

Sahm, H. und Schoberth, S. (1978/79): Mikrobielle Umsetzung von pflanzlichen Rückständen. Jahresbericht KFA Jülich GmbH

Salyers, A.A., Vercellotti, J.R., West, S.E.H., Wilkins, T.D. (1977a): Fermentation of Mucin and Plant Polysaccharides by Strains of *Bacteroides* from the Human Colon. Appl. Envir. Microbiol. 33, 319-322

Salyers, A.A., West, S.E.H., Vercellotti, J.R.,Wilkens, T.D. (1977b): Fermentation of Mucins and Plant Polysaccharides by Anaerobic Bacteria from the Human Colon. Appl. Envir. Microbiol. 34, 529-533

Salyers, A.A., Gherardini, F., O'Brien, M. (1981): Utilization of Xylan by Two Species of Human Colonic *Bacteroides*. Appl. Envir. Microbiol. 41, 1065-1068

Schmid, K. (1964): Methods for the Isolation, Purification and Analysis of Glycoproteins- a Brief Review. Chimica 18, 321-327

Schmidt, B., John, M., Niefind, H.J., Moonen, H. (1981): Hochdruckfüssigkeits-Chromatographie (HPLC) von Kohlenhydraten in Würze und Bier. Brauwissenschaft 34, 114-117

Sinner, M.H. (1974): Enzymatische Hydrolyse von Holzxylanen. Dissertation, Universität Hamburg

Sinner, M. (1975): β-1,4-Xylan-4-xylanohydrolasen (E.C. 3.2.1.8.) und ihre Wirkung auf Laubholzxylane. Mitt. Bundesforsch. Forst. Holzwirt. Reinbeck bei Hamburg, 104, 1-56

Smith, M.M., Hartley, R.D., Galliard, T. (1981): Ferulic Acid Substitution of Cell Wall Polysaccharides of Wheat Bran. Biochem. Soc. Trans. 9, 165P

Sobczak, J.Z., Urbanek, H. (1981): Cellulose and Xylan Degrading Enzymes of *Fusarium avenaceum*. Arch. Microbiol. 129, 247-250

Somogyi, M. (1952): Notes on Sugar Determination. J. Biol. Chem. 195, 19-23

Sørensen, H. (1957): Microbial Decomposition of Xylan. Acta Agric. Scand. Suppl. 1, 4-86

Spiro, R.G. (1970): Glycoproteins. Ann. Rev. Biochem. 39, 599-638

Spiro, R.G. (1972): Study of the Carbohydrates of Glycoproteins. In: Methods in Enzymology 28 B, 3-43. Hrg.: Colowick, S.P. und Kaplan, N.O. Academic Press New York, London

Sreenath, H.K., Joseph, R., Murthy, V.S. (1978): Studies on Xylan Hydrolases from Different Strains of *Streptomyces* and Their Mutual Influences in the Breakdown of Xylan. Folia Microbiol. 23, 299-303

Stahl, E. (1969): Thin-Layer Chromatography 2. Auflage, 888, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Stevens, B.J.H. und Payne, J. (1977): Cellulase and Xylanase Production by Yeasts of the Genus *Trichosporon*. J. Gen. Microbiol. 100, 381-393

Strobel, G.A. (1963): A Xylanase System Produced by *Diplodia viticola*. Phytopathology. 53, 592-596

Stüttgen, E. (1976): Kopplung von Mannan an Reaktivfarbstoffe und Nachweis von extrazellulären, mikrobiellen mannanabbauenden Enzymen über den Diffusionstest. Diplomarbeit, RWTH Aachen

Takahashi, M. und Hashimoto, Y. (1963): Studies on Bacterial Xylanase (III). Crystallization and Some Enzymatic Properties of Bacterial Xylanase. J. Ferment. Technol. 41, 181-186

Takahashi, M und Kutsumi, S. (1979): Purification and Properties of Xylanase from *Gliocladium virens*. J. Ferment. Technol. 57, 434-439

Takenishi, S., Tsujisaka, Y., Fukumoto, J. (1973): Studies on Hemicellulases. IV. Purification and Properties of the -Xylosidase Produced by *Aspergillus niger* van Tieghem. J. Biochem. 73, 335-343

Takenishi, S. und Tsujisaka, Y. (1975): On the Modes of Action of Three Xylanases Produced by a Strain of *Aspergillus niger* van Tieghem. Agr. Biol. Chem. 39, 2315-2323

Tangnu, S.K., Blanch, H.W., Wilke, Ch.R. (1981): Production of Xylanase by *Streptomyces xylophagus nov. sp.* Acta Biotechnologica 1, 31-40

Toda, S., Suzuki, H., Nisizawa, K. (1971): Some Enzymic Properties and the Substrate Specificities of *Trichoderma* Cellulases with Special Reference to Their Activity toward Xylan. J. Ferment. Technol. 49, 499-521

Varadi, J., Necesany, V., Kovacs, P. (1971): Cellulase and Xylanase of Fungus *Schizophyllum commune*. III. Purification and Properties of Xylanase. Drevarsky vyskum 16, 147-159

Voelter, W., Bauer, H., Hofmann, W.U. (1974): Hydrolyse und Trennmethoden von Kohlenhydraten. Fachzeitschrift für das Labor. Heft April, Seiten 331-334, Heft Mai, Seiten 444-446. G-I-T Verlag Ernst Giebeler, Darmstadt

Webb, J.L. (1966): Enzyme and Metabolic Inhibitors II. Academic Press, New York, London

Weber, K. und Osborn, M. (1969): The Reliability of Molecular Weight Determination by Dodecyl Sulfate-Polyarylamide Gel Electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412

Whistler, R.L. und Masak, J.E. (1955): Enzymatic Hydrolysis of Xylan. J. Amer. Cem. Soc. 77, 1241-1243

Wu, Y.V. und Scheraga, H.A. (1962): Studies of Soybean Trypsin Inhibitor. I. Physicochemical Properties. Biochemistry 1, 698-705

Zacharius, R.M. und Zell, T.E. (1969): Glycoprotein Staining following Electrophoresis on Acrylamide Gels. Anal. Biochem. 30, 148-152

Zinbo, M. und Timell, T.E. (1965): The Degree of Branching of Hardwood Xylans. Svensk. Papp-Tidn. 68, 647-662

Lebenslauf

19.2.1949	geboren in Schlich, Krs. Düren
1955 - 1960	Besuch der Volksschule in Schlich
1960 - 1969	Besuch des Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Düren
1969 - 1970	Wehrpflichtiger bei der Bundeswehr
1971 - 1976	Studium der Biologie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
April 1973	Diplom-Biologen-Vorprüfung
Dezember 1976	Diplom-Biologen-Hauptprüfung mit den Fächern: Zoologie, Botanik, Mikrobiologie und organische Chemie. Die Diplomarbeit wurde bei Herrn Prof. Dr. C.C. Emeis am Institut für angewandte Biologie der RWTH Aachen angefertigt.
1977 - 1981	Arbeit an vorliegender Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Sahm am Institut für Biotechnologie I der Kernforschungsanlage Jülich.